



Réponse des ostéoblastes à des stimulations physiques basées sur des contraintes mécaniques basses amplitudes hautes fréquences. Implication en ingénierie tissulaire

Virginie Dumas

► To cite this version:

Virginie Dumas. Réponse des ostéoblastes à des stimulations physiques basées sur des contraintes mécaniques basses amplitudes hautes fréquences. Implication en ingénierie tissulaire. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2010. Français. NNT : 2010STET001T . tel-00670904

HAL Id: tel-00670904

<https://theses.hal.science/tel-00670904>

Submitted on 16 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Titre Thèse : Réponse des ostéoblastes à des stimulations physiques basées sur des contraintes mécaniques basses amplitudes hautes fréquences. Implication en ingénierie tissulaire

Résumé :

Lors des activités physiques à impact (dites ostéogéniques) l'os est soumis à plusieurs types de stimulations : des contraintes mécaniques d'amplitude et de fréquence variables mais également à des champs électriques. Les mécanismes par lesquels les charges mécaniques et électriques agissent sur le tissu osseux dans son ensemble, et sur les ostéoblastes, en particulier, sont encore mal compris. Chacun de ces stimuli physiques joue un rôle dans la mécano-transduction puisque les cellules ostéoblastiques répondent aux différents types de contraintes mécaniques ainsi qu'aux stimulations électriques. Partant de ce constat, la réponse des ostéoblastes soumis à un seul type de stimulus physique a été comparée à celle obtenue par des combinaisons de plusieurs signaux mécaniques et/ou électriques. Dans la perspective d'améliorer l'ostéointégration des biomatériaux, nos études ont porté principalement sur les deux composants essentiels pour le succès de la greffe d'un biomatériau : la matrice extracellulaire (MEC) qui sert d'interface entre le biomatériau et l'hôte ainsi que les facteurs angiogéniques qui assurent la vascularisation de l'implant.

Nous avons étudié les réponses des ostéoblastes à des contraintes mécaniques complexes basées sur des signaux de « basse amplitude haute fréquence » (BAHF) appliquées à un modèle de culture 3D (hydroxyapatite macroporeux). Les différentes combinaisons de signaux en compression correspondent à une sinusoïdale basse fréquence (3Hz) d'amplitude de $1000\mu\epsilon$ sur laquelle ont été superposées différentes BAHF modulables en fréquences ($\approx 200\mu\epsilon$ à 25, 50 et 100Hz). Le signal de 3Hz, sans ajout de BAHF, augmente faiblement les ARNm du collagène et de la fibronectine. Si on superpose à ce signal des BAHF à 50 ou 100 Hz, on diminue l'expression des protéines matricielles. En revanche, l'ajout de BAHF à 25Hz renforce l'effet de la contrainte sinusoïdale 3Hz sur les protéines matricielles (collagène et fibronectine) et augmente le VEGF matriciel (ARNm et protéine). Nous montrons donc qu'une stimulation mécanique simple (3Hz) peut être potentialisée par des BAHF appropriées. Nous avons ainsi défini un régime combiné (3Hz+25Hz) capable de fonctionnaliser des céramiques 3D cellularisées.

De part ses propriétés piézoélectriques, l'os soumis à des déformations mécaniques engendre des potentiels électriques. Nous nous sommes donc intéressés à des signaux mécaniques et électriques typiquement produits par les matériaux piézoélectriques. Un dispositif a été développé pour appliquer des stimuli très BAHF sur des modèles de culture 2D. La synthèse de la MEC est favorisée et ses propriétés ostéogéniques, évaluées sur des cellules souches mésenchymateuses, sont augmentées sous BAHF. Les BAHF n'ont pas d'effet sur le VEGF. Un autre dispositif a permis d'appliquer un champ électrique aux cultures cellulaires. Quelques paramètres nous indiquent que les cellules perçoivent le champ électrique, mais nous retenons que le VEGF n'est pas affecté. En revanche, la combinaison de ces stimulations physiques (contrainte mécanique très BAHF et champ électrique) augmente l'expression de plusieurs facteurs impliqués dans l'angiogénèse (VEGF, TGF β 1, FGF2...) sur les ostéoblastes primaires. Cette étude préliminaire serait donc en faveur du développement de biomatériaux ayant des propriétés piézoélectriques qui favoriseraient la croissance osseuse par stimulation mécanique ou/et électrique.

Ainsi, la combinaison de plusieurs stimulations physiques permet d'améliorer les réponses cellulaires en agissant à la fois sur la MEC et sur les facteurs angiogéniques. Les sollicitations complexes définies dans cette thèse pourraient être un outil pour fonctionnaliser un substitut osseux cellularisé.

Mots Clés: Ostéoblastes, matrice extra-cellulaire, VEGF, contrainte mécanique, basse amplitude haute fréquence, champ électrique, biomatériaux.

Directeur et co-directeur de Thèse: Dr Laurence VICO et Pr Daniel GUYOMAR

Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux (LBTO)- INSERM U890- Faculté de Médecine J. Lisfranc
Université Jean Monnet 15 rue A. Paré 42023 Saint-Etienne cedex2 France.

THESE DE DOCTORAT

Spécialité: BIOLOGIE MOLECULAIRE et CELLULAIRE

Présentée par

Virginie DUMAS

à

L'Université Jean Monnet de Saint-Étienne

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE JEAN MONNET SAINT-ETIENNE

**Réponse des ostéoblastes à des stimulations physiques basées sur
des contraintes mécaniques basses amplitudes hautes fréquences.**

Implication en ingénierie tissulaire

Composition du Jury:

Monsieur le Docteur Frédéric MALLEIN-GERIN
Madame le Docteur Karine ANSELME
Monsieur le Professeur Daniel HARTMANN
Madame le Docteur Aline RATTNER
Monsieur le Professeur Daniel GUYOMAR
Madame le Docteur Laurence VICO

Lyon
Mulhouse
Lyon
Saint-Etienne
Lyon
Saint-Etienne

Rapporteur
Rapporteur

REMERCIEMENTS

Au terme de mon travail, je souhaite remercier le docteur **Laurence VICO-POUGET** pour m'avoir donné l'opportunité de poursuivre une thèse dans son Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux (LBTO), et pour avoir encadré ce travail en qualité de directeur de thèse. Je lui suis reconnaissante de m'avoir permis de participer à un congrès international, ce fut une expérience inoubliable et très enrichissante scientifiquement. Merci aussi de m'avoir toujours soutenue dans mes projets, pour mon poste d'ATER et en général dans mes activités liées à l'enseignement.

Je souhaite témoigner ma très grande gratitude à mon encadrante **Aline RATTNER** qui m'a apportée une aide précieuse et guidée mes pas tout au long de ce travail. Merci de m'avoir toujours soutenue et d'avoir su me motiver dans les moments de doute. Ces quatre années passées à travailler ensemble ont été très agréables et m'ont beaucoup apportées.

Merci au professeur **Daniel GUYOMAR**, directeur du de Génie et Ferroélectricité (LGEF), pour avoir encadré mon travail en tant que co-directeur de thèse et pour ses conseils en physique.

Je souhaite également remercier deux autres membres du LGEF, **Benjamin DUCHARNE** et **Lionel PETIT**, pour leurs conseils, leurs mesures et leurs modélisations des contraintes mécaniques et champs électriques utilisés dans cette thèse.

Je remercie également le docteur **Alain GUIGNANDON** pour son aide et son expertise en analyse d'image.

Un grand merci aux Docteurs **Luc MALAVAL** et **Marie-Hélène LAFAGE-PROUST** pour leurs corrections en anglais et leurs précieuses relectures.

Mes remerciements vont aussi aux autres membres du Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux et tout particulièrement à **Sylvie PEYROCHE**, **Norbert LAROCHE**, **Arnaud VANDENBOSSCHE**, **Marie-Thérèse LINOSSIER** et **Chantal ROCHE** pour leurs conseils scientifiques, leurs remarques utiles, ou leur assistance technique et administrative. Je tiens notamment à exprimer ma gratitude à **Mireille THOMAS** qui a réalisé les microarrays et m'a fait gagner un temps précieux.

Je remercie les masters, doctorants et post-doc du laboratoire **Marieme WADE-GUEYE**, **Farida GUENICHE**, **Guénaëlle BOUËT**, **Marion PASQUALINI**, **Cédric LAVET**, **Bernard ROCHE**, **Fabrice McWAY**, **Rhonda PRISBI** et **Alexis VALLARD** pour leur sympathie et leur gaîté.

En particulier, ceux qui ont partagé mon bureau ces deux dernières années **Anthony PERRIER** et **Carole FOURNIER** sont devenus des amis très proches. Je les remercie pour leurs conseils, leur soutien, leur amitié et les activités extra-labo. J'espère ne pas les voir partir trop loin.

Je tiens aussi à dire merci à **ma famille, mes parents, ma sœur et mes grands parents** qui ont toujours été là dans les moments difficiles.

Enfin un merci particulier à **Florian AVENAS** pour m'avoir prêté son « précieux » R4000, pour son aide en physique et bien sur pour faire mon bonheur en étant près de moi tous les jours.

Un clin d'œil à **mon petit bout** qui a du subir mon stress durant ces dernières semaines de rédaction.

Je remercie le **Cluster MACODEV** et la **Région Rhone Alpes** pour leurs séminaires, activités scientifiques et leur soutien financier.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	13
<u>I. BIOLOGIE DU TISSU OSSEUX</u>	15
<u>I.1. Physiologie osseuse</u>	15
I.1.1. Généralités	15
I.1.2. Les propriétés mécaniques du tissu osseux	16
➤ Les paramètres mécaniques du tissu osseux	16
➤ Déformations : amplitude et fréquence mesurées au niveau du tissu osseux	18
I.1.3. Les propriétés électriques de l'os	20
➤ Découverte de la piézoélectricité de l'os	20
➤ Le collagène responsable de la piézoélectricité de l'os	21
➤ Les potentiels de flux ou "streaming potentials"	22
I.1.4. Les cellules osseuses et le remodelage osseux	24
➤ Les ostéoclastes : effecteurs de la résorption osseuse	24
➤ Les ostéoblastes : effecteurs de la formation osseuse	24
➤ Le remodelage du tissu osseux	26
<u>I.2. La matrice osseuse</u>	26
I.2.1. La phase organique	26
➤ Le collagène	27
➤ Les protéines non collagéniques	27
➤ Les autres protéines non collagéniques	32
I.2.2. Matrice et facteurs de croissance	33
I.2.3. La phase minérale	36
I.2.4. Les interactions MEC-ostéoblastes et MEC-CSMs	36
➤ La plaque d'adhésion focale	37
➤ La matrice, un microenvironnement 3D : son influence sur la différenciation des progéniteurs mésenchymateux.	38
<u>I.3. Réponses du tissu osseux aux contraintes mécaniques</u>	39
I.3.1. Généralités	39
I.3.2. Les effets de l'activité physique sur le tissu osseux	41
I.3.3. Les effets des basses amplitudes hautes fréquences sur le tissu osseux	42
<u>I.4 Réponses du tissu osseux aux stimulations électriques exogènes</u>	43
I.4.1. L'Histoire	43
I.4.2. La stimulation électrique : un traitement pour la réparation fracturaire	44
<u>II. LA CULTURE DE CELLULES OSTEOLASTIQUES</u>	45
<u>II.1. Le phénotype ostéoblastique</u>	45
<u>II.2. Les modèles cellulaires</u>	46
II.2.1. Progéniteurs mésenchymateux : Les C3H10T1/2	46
II.2.2. Pré-ostéoblastes : Les MC3T3-E1	47
II.2.3. Les ostéoblastes : Les MG63	48
II.2.4. Les ostéoblastes primaires humains	48

<u>II.3. Les conditions de culture cellulaire tridimensionnelle</u>	49
<u>II.4. Propriétés électriques des cellules en culture</u>	50
II.4.1. Le potentiel transmembranaire	50
II.4.2. Le cytoplasme et le milieu de culture : des milieux conducteurs	52

III. CULTURES OSTEOBLASTIQUES (3D, 2D) SOUS CONTRAINTES MECANQUES

<u>III.1. Les contraintes appliquées à des cultures ostéoblastiques 3D : dispositifs et effets</u>	53
III.1.1. L'ostéointégration des biomatériaux favorisée par stimulation mécanique	53
III.1.2. Les céramiques de phosphates de calcium	54
III.1.3. La dimension des pores et la porosité : un compromis entre ostéogénèse et propriétés mécaniques	55
III.1.4. La compression	57
➤ Les dispositifs d'application d'une contrainte en compression	57
➤ L'exemple du Zetos : un dispositif de compression mécanique	58
➤ Réponse des ostéoblastes aux contraintes mécaniques en compression	60
III.1.5. La déformation des cultures osteoblastiques 3D par alternance de traction et compression	61
<u>III.2. Cultures ostéoblastiques 2D et contraintes mécaniques</u>	62
III.2.1. Les principaux dispositifs de traction et compression pour cultures 2D	62
➤ L'étirement uniaxial	62
➤ L'étirement par flexion du substrat	63
➤ L'étirement biaxial	64
III.2.2. Dispositif générant des contraintes mécaniques BAHF	65
III.2.3. Les effets des contraintes mécaniques sur les cultures ostéoblastiques 2D	67
➤ La prolifération et la différenciation	67
➤ La production d'oxyde nitrique	69
➤ L'axe cytosquelette-intégrines	70
➤ Les protéines matricielles et les facteurs de croissance	72

IV. CULTURES OSTEOBLASTIQUES 2D SOUS STIMULATIONS ELECTRIQUES

<u>IV.1. Les dispositifs d'application des stimulations électriques</u>	74
IV.1.1. Les dispositifs de stimulation électrique avec une intensité de courant	74
IV.1.2. Les dispositifs de stimulation électrique sans intensité de courant	76
<u>IV.2. Réponses des ostéoblastes aux stimulations électriques</u>	78
IV.2.1. La prolifération et la différenciation cellulaire	78
IV.2.2. La migration et l'orientation cellulaire	79
IV.2.3. La production de messagers secondaires : NO et Ca ²⁺	82
IV.2.4. La production de facteurs de croissance	83

OBJECTIFS	85
<u>V. RESULTATS</u>	87
<u>V.1. PREMIERE PARTIE : Réponses cellulaires à la combinaison de deux stimulations mécaniques</u>	87
Article 1	87
➤Résumé de l'article 1	88
➤Perspectives et conclusion de la première partie	90
<u>V.2. DEUXIEME PARTIE : Réponses cellulaires à la combinaison d'une stimulation mécanique « basse amplitude-haute fréquence » et d'un champ électrique</u>	91
V.2.1 Article 2 : Réponses cellulaires à la stimulation mécanique « basse amplitude-haute fréquence »	92
➤Résumé de l'article 2	93
➤Résultats complémentaires de l'article 2	95
V.2.2. Réponses cellulaires au champ électrique	98
➤Matériels et méthodes	98
➤Résultats : Réponses des cellules en culture au champ électrique	110
V.2.3. Réponses cellulaires à la double stimulation (champ électrique et stimulation mécanique BAHF)	118
➤La prolifération	118
➤Le VEGF	119
➤Expression des facteurs impliqués dans l'angiogénèse	120
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	123
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133
PRODUCTIONS PERSONNELLES	148
ANNEXES	149

LISTE DES ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Arg : arginine
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
Asp : acide aspartique
ATP : Adénosine TriPhosphate

B

BAHF : basses amplitudes hautes fréquences
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BSP : Bone Sialo-Protein

C

Ca : calcium
Cbfa-1 : Core Binding Factor A1
ColI : Collagène de type I
cox1/3 : cyclooxygénase1/3
C-Ter : extrémité C-Terminale
CSMs : Cellules Souches Mésoenchymateuses

E

EGF : Epidermal Growth Factor
ERK1/2: Extracellular signal-Regulated Kinase 1 and 2
Est-1 (v-est) : erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1

F

FAK : Focal Adhésion Kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor
Flt-1 : fms-like tyrosine kinase receptor 1
FN :fibronectine

G

GAG : GlycosAminoGlucans
GTPases : Guanosine TriPhosphatase

H

HAP : HydroxyAPatite
HIF1 : Hypoxia Inductible Factor 1

I

IGF : Insulin-like Growth Factor
IL8 : InterLeukine 8
IL6 : InterLeukine 6

K

KDa : kilo Dalton
KDR : Kinase-insert-Domain-Receptor

M

MAPK : Mitogen Protein Activated Kinase
M-CSF : macrophage colony-stimulating factor
MEC : Matrice Extra-Cellulaire
Mek : Mitogen-extracellular kinase
Min : minute
MMP : Métalloprotéinase Matricielle

N

NO: monoxyde d'azote
NOS : Nitric Oxyde Synthase
ecNOS : Endothelial Nitric Oxyde Synthase
nNOS : Neuronale Nitric Oxyde Synthase
iNOS : Inductible Nitric Oxyde Synthase

O

OPN : Ostéopontine

P

PAL : Phosphatase Alcaline
PDGF : Platelet Derived Growth
PEDF : Pigment Epithelial Derived Factor
PF4: platelet factor 4
PKC : Protein Kinase C
PIGF : Placental Growth factor
PLC : Phospholipase C
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PVDF : PolyVinylidene Fluoride

R

Runx2: Runt-related transcription factor-2

T

TGF : Transforming Growth Factor

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

3D: Tridimensionnelle

Unités :

MPa : Mega Pascal

$\mu\epsilon$: microstrain

ϵ : strain

A : Ampère

V : Volt

V/m : Volt par mètre

S : Siemens

Ω : Ohm

Définitions des termes physiques :

Strain ou microstrain : c'est le rapport entre l'allongement (ou rétrécissement) de l'objet (ΔL) et sa longueur originelle (L) : $\Delta L/L$ ($\mu\text{m}/\text{m}$) sachant que $1\mu\text{m}/\text{m} = 10^{-4} \% = 1\mu\epsilon$. Par convention les valeurs de microstrain négatives font référence à une compression et les valeurs positives à une traction.

Courant électrique (ampère): c'est un déplacement d'ensemble de porteurs de charge électrique (électrons).

La conductivité électrique (siemens par mètre): C'est l'aptitude d'un matériau à laisser les charges électriques se déplacer librement, autrement dit à permettre le passage du courant électrique. C'est l'inverse de celle de la **résistivité (ohm.mètre)**.

La permittivité (ampères-seconde par volt par mètre ou adimensionnelle): C'est la propriété physique qui décrit la réponse d'un milieu donné à un champ électrique. Au niveau microscopique, la permittivité d'un milieu est liée à la polarisabilité électrique des molécules ou atomes constituant le matériau.

Champ électrique (volt par mètre): Le champ électrique est l'expression des forces F qui résulteraient de l'action à distance de particules électriquement chargées sur une particule test, divisée par la valeur de la charge de cette particule test q soit $E = F/q$. Un champ électrique a, en tout point de l'espace, une direction, un sens, et une grandeur (V/m) qui dérive du potentiel électrique. Le champ électrique est directement relié au potentiel électrique V par la formule : $\vec{E} = -\overrightarrow{\text{grad}} V$. Il est représenté par un champ vectoriel qui à tout point de l'espace associe une direction, un sens, et une norme correspondant à la valeur (ou amplitude) du champ électrique.

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Stimulations physiques intervenant dans l'environnement des cellules osseuses (Rubin, Rubin et al. 2006).....	14
Figure 2 : Anatomie du tissu osseux	16
Figure 3 : Coupe transversale du système de Havers ou ostéon trouvé dans l'os compact. Canal de Havers (HC), Lamelles (LA), osteocytes (OC), lacune (LAC), canalicules (CAN), canal de Volkmann (VC), ligne cémentante (CL). Image d'après " the School of Anatomy and Human Biology in the University of Western Australia".	17
Figure 4 : Reconstruction 3D par microtomographie (Scanco Medical, www.scanco.ch/) d'une coupe transversale de tibia.....	18
Figure 5 : Représentation schématisée des conséquences d'une force de flexion imposée à un os. La partie haute, sous traction, est allongée ($\Delta L > L$), et la partie basse, sous compression, est rétrécie ($\Delta L < L$).....	19
Figure 6 : Amplitude des déformations mesurées sur le tibia de différentes espèces en fonction de leur fréquence d'apparition durant une activité de locomotion journalière normale. D'après Fritton, McLeod et al. 2000.....	19
Figure 7 : Polarisation d'un fémur sous l'effet d'une déformation	21
Figure 8 : Potentiels générés par les mouvements liquidiens dans les canalicules osseux (Turner and Pavalko 1998).....	23
Figure 9 : L'ostéoblaste produit la matrice ostéoïde puis la minéralise	25
Figure 10 : Structure du monomère de fibronectine (Mao and Schwarzbauer 2005)	29
Figure 11 : Les grandes étapes de la fibrillogénèse d'après (Mao and Schwarzbauer 2005)	30
Figure 12 : Résumé succinct des effets du VEGFA en fonction de sa concentration (Yla-Herttuala, Rissanen et al. 2007)	33
Figure 13 : Les interactions MEC-ostéoblastes d'après (Harjanto and Zaman).....	37
Figure 14 : La liaison des intégrines à la MEC est suivie de leur regroupement et de leur interaction avec le cytosquelette via la plaque d'adhésion focale (Mittra, Hanson et al. 2005).....	37
Figure 15 : Le mécanostat selon Frost. (D'après Lafage-Proust et Coll, 1999).	40
Figure 16 : Théorie du mécanostat selon Frost d'après (Basso and Heersche 2002)	41
Figure 17 : Expression séquentielle des marqueurs de différenciation par les cellules ostéoblastiques (Stein, Lian et al. 2004).....	46
Figure 18 : Exemples de bioréacteurs pouvant être utilisés pour l'ensemencement et/ou pour appliquer des forces de cisaillement à des cultures cellulaires 3D d'après Martin 2004.	50
Figure 19 : Le potentiel de membrane (d'après (McCaig, Rajnec et al. 2005).....	51
Figure 20 : Schéma de la déformation cellulaire en réponse au type de contrainte mécanique appliqué d'après Basso et al. (Basso and Heersche 2002).....	53
Figure 21 : Contrainte admissible en fonction du volume poreux du biomatériau (Le Huec et al. 1995).....	56
Figure 22 : Les dispositifs de mise en déformation par compression d'après Brown, 2000. (a) Principe de la compression hydrostatique (b) Principe de la compression mécanique	58
Figure 23 : Détails du dispositif de contrainte du ZetOs. Grâce à un mécanisme de senseurs et d'effecteurs piézo-électriques, une contrainte en déplacement est appliquée par l'aire sphérique sur le piston de la chambre de culture, renfermant un biomatériau. (cf. texte pour les explications).	59
Figure 24 : Schéma de la chambre de contrainte du système ZetOs.....	60
Figure 25 : Schéma d'un stimulateur mécanique appliquant successivement une traction et une compression à des cultures 3D dans des matrices collagéniques (Tanaka, Li et al. 2003). (1) Gel de collagène cellularisé, (2) ventouse mobile, (3) ventouse fixe, (4) actionneur piézoélectrique.....	61
Figure 26 : L'étirement uniaxial du tissu osseux produit une contrainte biaxiale : une traction parallèle à l'étirement et une compression dans le plan perpendiculaire (d'après Basso 2002)	63
Figure 27 : Dispositif de mise en déformation par étirement longitudinal du substrat d'après Brown, 2000.....	63
Figure 28 : Dispositif de mise en déformation par flexion du substrat d'après Brown, 2000.....	64
Figure 29 : Dispositifs de mise en déformation par distension du substrat sans déplacement du plan du support d'après Brown, 2000.....	65
Figure 30 : Dispositifs de mise en vibration d'une culture ostéoblastique (déplacement dans le plan horizontal) Rosenberg 2002.....	66
Figure 31 : Dispositif d'application d'un champ électrique perpendiculairement à la culture cellulaire induisant un courant électrique (Kim, Song et al. 2006).....	74
Figure 32 : Chambre de culture pour stimulation électrique parallèle à la culture cellulaire (Song, Gu et al. 2007).....	75
Figure 33 : Chambre de culture pour stimulation électrique parallèle à la culture cellulaire (Mendoza 2003; Curtze, Dembo et al. 2004)	75

Figure 34 : Chambre de culture pour stimulation électrique avec renouvellement du milieu de culture (Song, Gu et al. 2007).....	76
Figure 35 : Dispositifs de stimulation électrique d'après Wiesmann (Wiesmann, Hartig et al. 2001).....	77
Figure 36 : Circuits correspondants au mode capacitif ou semi-capacitif (Wiesmann, Hartig et al. 2001) (R=Résistance, C=capacité). Air (Ra, Ca), milieu de culture (Rm, Cm), tapis cellulaire (Ro, Co), polystyrène (Rc, Cc).....	77
Figure 37 : Modèles de chemotaxie (A) et d'électrotaxie (B) d'après McCaig 2005	80
Figure 38: Expression génique des protéines matricielles normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm erreur type. n = 4; Témoin vs BAHF fractionnées p<0,05.....	95
Figure 39 : Répartition des NO synthases (iNOS), de l'appareil de Golgi (GM130) et des noyaux (DAPI) après 3 épisodes de BAHF.....	96
Figure 40 : Quantification de la fluorescence moyenne par cellule. Valeurs exprimées en pourcentage du témoin. n=3, 10 images par échantillons, p<0.05.	96
Figure 41 : Expression génique du VEGFA et de ces récepteurs normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline (A). Taux protéique de VEGFA mesuré sur lysats cellulaires (VEGF matriciel) ou milieu de culture (VEGF soluble) (B). Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm erreur type. n = 5; Témoin vs 1 BAHF p<0,05.....	97
Figure 42 : Électrodes d'argent en « demi lune » : champ électrique parallèle à la culture ostéoblastique (vue de dessus et coupe transversale). d= distance entre les électrodes.	99
Figure 43 : Modélisation de la répartition des (A) potentiels sur chaque électrode et (B) de l'amplitude du champ électrique selon Ox.....	100
Figure 44 : Électrodes d'argent en « arc de cercle » sur les bords de la boîte de Petri: champ électrique parallèle à la culture ostéoblastique (vue de dessus et coupe transversale). d= distance entre les électrodes. .	100
Figure 45 : Condensateur à plaques parallèles (France 3D scientifique U300400).....	101
Figure 46 : Schéma du condensateur à plaques parallèles : deux directions de champ électrique possibles selon la disposition des électrodes	102
Figure 47 : Modélisation qualitative (A) des potentiels (B) des lignes de champ (les flèches bleu clair sont orientées de haut en bas) et (C) de la valeur du champ électrique perpendiculaire à la culture cellulaire.	103
Figure 48 : Tension sinusoïdale avec offset.....	104
Figure 49 : Test dit de « lésion » pour étudier la migration cellulaire.....	109
Figure 50 : Lésions parallèles ou perpendiculaires au champ électrique // à la surface de la culture	109
Figure 51 : Lésion parallèle (A) ou perpendiculaire (B) à la direction du champ électrique dans des cultures témoins ou soumises au champ électrique parallèle (condensateur 400Hz). Photographies (X50) réalisées à t0 ou t36 heures après la lésion.	112
Figure 52: Surface de la lésion parallèle à la direction du champ (//) ou perpendiculaire à la direction du champ électrique dans des cultures témoins ou soumises au champ électrique parallèle (condensateur 400Hz). Surface quantifiée 0 heure ou 36 heures après la lésion. Moyenne \pm écart type n= 4, 20 images par lésion p<0.05 *significatif par rapport à la lésion témoin, # significatif par rapport à la lésion \perp 36 heure après l'application du champ électrique.	112
Figure 53 : Prolifération cellulaire des MC3T3-E1, ostéoblastes primaires et C3H10T1/2. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs Témoin à 3 jours ou 5 jours de culture, en moyenne \pm écart type. n = 4; Témoin vs Champ électrique \perp p<0,05.....	114
Figure 54 : Expression génique du VEGF normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline (A). Taux protéique de VEGFA mesuré sur lysats cellulaires (VEGF matriciel) ou milieu de culture (VEGF soluble) (B). Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm écart type. n = 4; Témoin vs champ électrique p<0,05.....	115
Figure 55 : Expression génique des isoformes du VEGF normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline (A). Taux protéique de VEGFA mesuré sur lysats cellulaires (VEGF matriciel) ou milieu de culture (VEGF soluble) (B). Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm écart type. n = 4; Témoin vs champ électrique p<0,05.	115
Figure 56 : Expression génique des marqueurs de différenciation PPAR γ 2 et Runx2 normalisée par l'expression du gène de ménage, la cyclophiline. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm écart type. n = 6; Témoin vs champ électrique p<0,05.....	116
Figure 57: Activité PAL mesurée sur lysats cellulaires des C3H10T1/2. Résultats exprimés en nmol/min/mg de protéine à 5 jours, en moyenne \pm erreur type. n = 4; Témoin vs champ électrique p<0,05.	117
Figure 58 : Photographies au contraste de phase (X100) des cultures C3H10T1/2 Témoin ou sous champ électrique \perp 400hz pendant 5 jours	117
Figure 59 : Prolifération des cellules primaires humaines. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs Témoin à 3 jours, en moyenne \pm écart type. n = 4; p<0,05.	118

<i>Figure 60 : Expression génique des isoformes du VEGF des ostéoblastes primaires normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm écart type. n = 4; Témoin vs double stimulation $p < 0,05$.</i>	119
<i>Figure 61 : Taux protéique de VEGFA des ostéoblastes primaires mesuré sur lysats cellulaires (VEGF matriciel) ou milieu de culture (VEGF soluble). Résultats exprimés en pourcentage des valeurs Témoin à 3 jours, en moyenne \pm erreur type. n = 8; Témoin vs double stimulation $p < 0,05$.</i>	120
<i>Figure 62: Expression génique des facteurs impliqués dans l'angiogénèse après 1 épisode de stimulation (BAHF, champ électrique[⊥] ou double stimulation) sur les ostéoblastes primaires. Valeurs exprimées par rapport aux témoins en moyenne n=2.</i>	121
<i>Figure 63 : Expression génique de facteurs impliqués dans l'angiogénèse après 1 épisode de stimulation (BAHF, champ électrique[⊥] ou double stimulation) sur les ostéoblastes primaires. Valeurs exprimées par rapport aux témoins en moyenne n=2.</i>	122
<i>Figure 64 : Spectre fréquentiel de la marche, après filtrage des composantes fréquentielles (A) inférieures à 10 Hz et (B) au delà de 10 Hz. (Thèse David V. 2006)</i>	125

INTRODUCTION

Le squelette est un tissu de soutien qui réajuste sa micro- et macro-architecture en fonction des contraintes mécaniques qu'il doit supporter. Ce réajustement s'effectue grâce à des interactions constantes entre les stimuli mécaniques (charge, tractions musculaires) et les activités cellulaires osseuses. Les activités cellulaires permettent, de manière coordonnée dans l'espace et le temps, de résorber l'os ancien et d'apposer de l'os nouveau. Les contraintes mécaniques telles que la pression ou les forces de cisaillement provoquent sur le tissu osseux des déformations locales de plus ou moins grande amplitude (rapportées en microstrain ($\mu\epsilon$), $10\,000\,\mu\epsilon = 1\%$ de déformation). De plus, il apparaît que l'adaptation osseuse à la contrainte mécanique se fait lors de contraintes dynamiques (à certaines fréquences) alors que les contraintes statiques n'entraînent pas de réponse tissulaire. Lors de la locomotion, des mesures ont montré que le tissu est naturellement soumis à de fortes amplitudes de déformations ($>1000\mu\epsilon$) mais seulement quelque fois par jour alors que de faibles déformations (10 à 100 $\mu\epsilon$) se produisent beaucoup plus fréquemment, jusqu'à des milliers de fois par jour. Ainsi, l'os est soumis à plusieurs types de régimes mécaniques qui possèdent des composantes "haute amplitude-basse fréquence" ou "basse amplitude-haute fréquence". Cependant la contrainte mécanique n'est pas le seul phénomène à intervenir. Le tissu osseux possède des propriétés piezoélectriques, sa déformation engendre une polarisation électrique. Dans les zones de pression des charges électropositives sont produites alors qu'au niveau des zones de traction apparaissent des charges électronégatives. D'autre part, les flux liquidiens engendrés par la contrainte entraînent eux aussi la formation de champs électriques appelés "potentiels de flux". Les mécanismes par lesquels les charges mécaniques et électriques agissent sur le tissu osseux, dans son ensemble, et sur les ostéoblastes, en particulier, sont encore mal compris. Cependant chacun de ces stimuli physiques [Figure 1](#) joue un rôle dans la mécano-transduction puisque les cellules osseuses répondent aux différents types de contraintes mécaniques ainsi qu'aux champs électriques. Ainsi, l'activation de l'ostéogénèse n'est certainement pas le résultat d'un seul type de stimulation mais de la combinaison de plusieurs signaux.

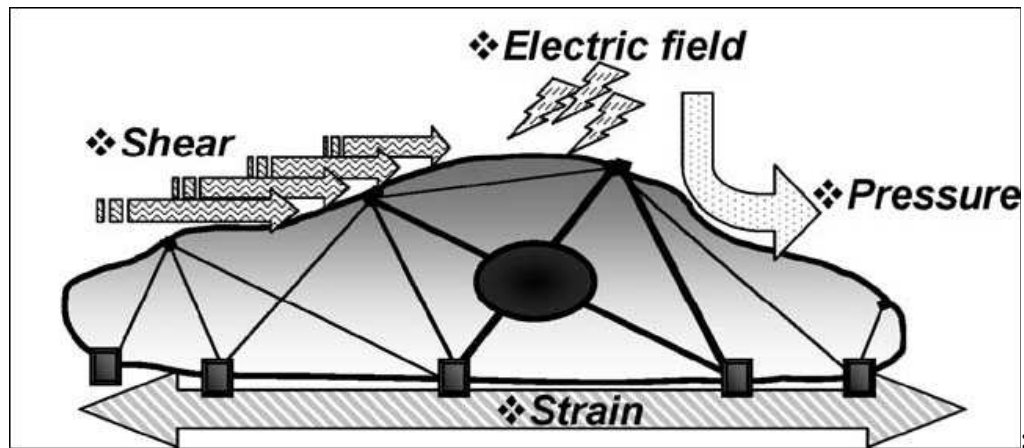


Figure 1 : Stimulations physiques intervenant dans l'environnement des cellules osseuses (Rubin, Rubin et al. 2006)

Après avoir situé ces stimulations physiques au niveau de la biologie du tissu osseux et les réponses qu'elles entraînent, nous rappellerons les principaux résultats de la littérature *in vitro* sur les dispositifs d'application de ces stimuli et leurs effets sur les cultures ostéoblastiques.

Le choix des stimulations utilisées dans ce travail, contraintes mécaniques basses amplitudes et champ électrique, a été guidé par le fait qu'elles ont l'avantage d'être applicables à des biomatériaux possédant une faible résistance mécanique. L'implication de ce travail en ingénierie tissulaire étant d'utiliser ces stimulations pour contrôler les activités ostéoblastiques. L'hypothèse générale de cette thèse était de vérifier que la réponse des ostéoblastes à une stimulation mécanique « basse amplitude-haute fréquence » (BAHF) pouvait être potentialisée par l'ajout d'une autre stimulation physique (mécanique ou électrique). Nous voulons aussi améliorer la production de matrice extracellulaire et de facteurs de croissance afin de favoriser l'ostéointégration de biomatériaux cellularisés.

I. BIOLOGIE DU TISSU OSSEUX

I.1. Physiologie osseuse

I.1.1. Généralités

L'os peut être défini comme un ensemble de cellules liées à une matrice extracellulaire, constituant la partie porteuse de l'appareil locomoteur.

Il a principalement trois fonctions :

- Une fonction mécanique, permettant le soutien du corps et la protection des organes.
- Une fonction métabolique, puisque le squelette constitue un réservoir de minéraux (calcium, phosphore, sodium, potassium, soufre, magnésium et cuivre) dont il régule la biodisponibilité.
- Une fonction hématopoïétique, puisque la cavité médullaire de certains os est le siège de l'hématopoïèse, qui assure la formation des globules blancs et rouges.

Chez l'humain et d'autres mammifères on distingue deux types d'os, ils sont classés selon la porosité et l'unité microarchitecturale [Figure 2, Figure 4](#) :

-L'os cortical, également connu sous le nom d'os compact. Il représente la majeure partie du squelette (80% environ). Il est métaboliquement peu actif, mais représente un capital calcique de réserve important.

-L'os trabéculaire, ou os spongieux. Il ne représente que 20% du squelette adulte. Il joue cependant un rôle majeur, d'une part dans l'équilibre phosphocalcique car il représente une surface d'échange considérable avec les liquides interstitiels. On le trouve principalement au niveau des épiphyses et des métaphyses des os longs et dans les corps vertébraux (à l'intérieur des cavités médullaires). Les travées osseuses sont entourées par du tissu adipeux et hématopoïétique richement vascularisé qui constitue la moelle osseuse.

Les travées sont formées de lames osseuses parallèles disposées en arcs de cercle interrompus par des lignes cémentantes, souvent irrégulières, qui témoignent d'une succession de cycles de résorption-apposition. On retrouve aussi ces cycles dans l'os cortical avec des osteons fermés.

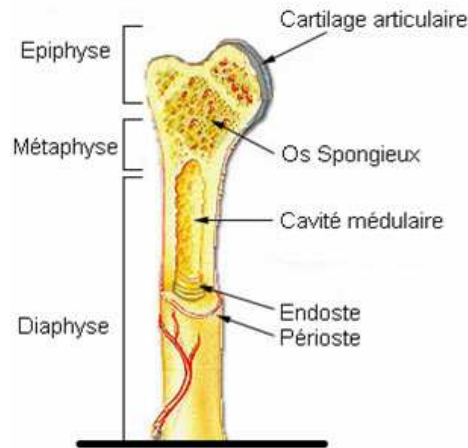


Figure 2 : Anatomie du tissu osseux

I.1.2. Les propriétés mécaniques du tissu osseux

➤ Les paramètres mécaniques du tissu osseux

L'organisation anatomique de l'os cortical et de l'os trabéculaire est sous la dépendance, entre autres, des contraintes mécaniques. Cette organisation a pour fonction essentielle d'alléger le poids du squelette, tout en optimisant son rendement mécanique. L'os cortical, compact, constitue la paroi externe de toute pièce osseuse alors que l'os trabéculaire, poreux se situe dans la région centrale [Figure 4](#). Le tissu osseux est caractérisé par d'excellentes propriétés mécaniques, alliant une bonne rigidité et une résistance à la rupture et à la fatigue importantes (100-200 MPa). (Dufour 2007).

La résistance de **l'os cortical** dépend de plusieurs paramètres. Certains facteurs sont extrinsèques et tiennent à la nature, la direction et la vitesse d'application des contraintes exercées. D'autres paramètres sont de nature intrinsèque et liés aux caractéristiques et propriétés même de l'os compact. La géométrie de la pièce osseuse, sa longueur, son épaisseur, ses diamètres endostique et périosté, etc. influencent les propriétés biomécaniques.. D'autre part, cet os compact est composé par une association dense d'unités cylindriques, appelées systèmes de Havers ou ostéons, orientées parallèlement à l'axe principal de l'os. L'ostéon est constitué par des lamelles osseuses concentriques. Les systèmes Haversiens peuvent être reliés entre eux latéralement par les canaux de Volkmann (permettant le passage de vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que de nerfs). Les ostéocytes sont situés dans les ostéons à la jonction lamellaire, ce sont des cellules mécanosensibles et répondent notamment aux forces de cisaillement induit par les mouvements de liquide à l'intérieur des canalicules (Cowin, Moss-Salentijn et al. 1991; Burger and Klein-Nulen 1999). Les canalicules relient les lacunes au

canal central de l'ostéon (diamètre = $0.1\mu\text{m}$) [Figure 3](#). Les ostéons, sont reliés entre eux par des lamelles interstitielles formées par les restes d'ostéons antérieurs, l'ensemble donnant une structure compacte, hétérogène, anisotrope et viscoélastique. Il ne présente donc pas une unicité de comportement en réponse à des contraintes mécaniques. Cette structure particulière confère à l'os cortical des propriétés de résistance et de rigidité. La contrainte à la rupture en compression de l'os cortical est de l'ordre de 150 MPa et le module de Young qui reflète l'élasticité s'élève à 20000 MPa.

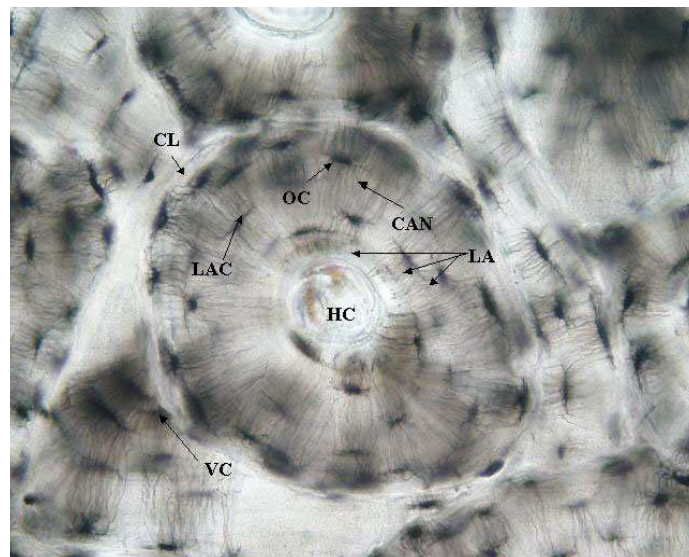


Figure 3 : Coupe transversale du système de Havers ou ostéon trouvé dans l'os compact. Canal de Havers (HC), Lamelles (LA), osteocytes (OC), lacune (LAC), canalicules (CAN), canal de Volkmann (VC), ligne cémentante (CL). Image d'après "the School of Anatomy and Human Biology in the University of Western Australia".

L'os trabéculaire joue également un rôle dans la résistance aux contraintes mécaniques. Il est constitué de travées osseuses reliées entre elles et formant un réseau tridimensionnel (figure 2) dont l'orientation est ajustée par rapport aux sollicitations mécaniques statiques et dynamiques exercées sur l'os. Les caractéristiques principales de la structure trabéculaire sont la porosité élevée (reflétée par la distance de séparation des travées) ainsi que l'architecture et l'orientation complexes d'un agencement compliqué de travées en plaques ou en colonnes. Ce sont les facteurs principaux contribuant à la rigidité de l'os trabéculaire. La résistance mécanique de l'os trabéculaire est plus faible que celle de l'os cortical puisqu'il possède une résistance à la rupture de 1 à 7 MPa et un module de Young de 80MPa.

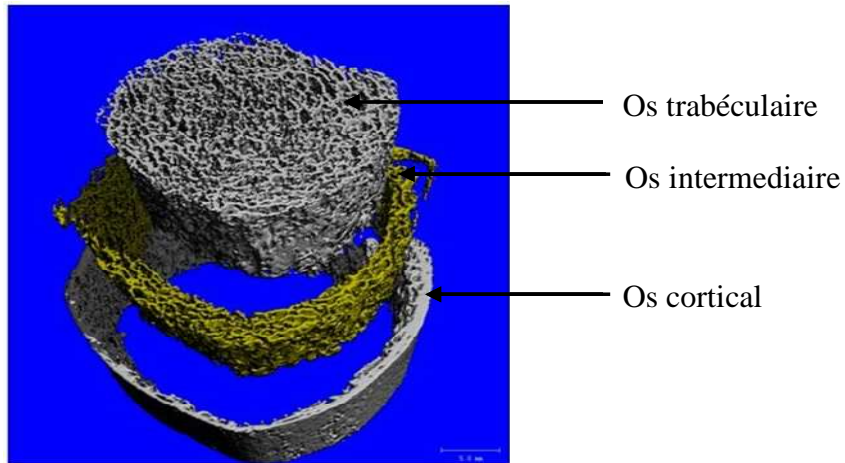


Figure 4 : Reconstruction 3D par microtomographie (Scanco Medical, www.scanco.ch/) d'une coupe transversale de tibia

➤ **Déformations : amplitude et fréquence mesurées au niveau du tissu osseux**

L'action des contraintes mécaniques sur le tissu osseux dépend de plusieurs paramètres tels que la répartition, l'amplitude et la fréquence des contraintes appliquées sur l'os. Les contraintes de compression ou de traction s'exercent perpendiculairement aux surfaces osseuses alors que les contraintes de cisaillement s'exercent parallèlement aux surfaces. En contrainte, le tissu se déforme, entraînant des déformations relatives locales rapportées en strain (ϵ) ou microstrain ($\mu\epsilon$), c'est le rapport entre l'allongement (ou rétrécissement) de l'objet (ΔL) et sa longueur originelle (L) : $\Delta L/L = 1\mu\text{m}/\text{m} = 10^{-4} \% = 1\mu\epsilon$. Par convention les valeurs de microstrain négatives font référence à une compression et les valeurs positives à une traction. L'os est rarement sujet à un seul type de force à la fois (pure traction, pure compression ou une pure torsion...) C'est une combinaison de forces qui agit sur lui. Les forces de traction sont générées sur la surface convexe et les forces de compression sur la surface concave [Figure 5](#).

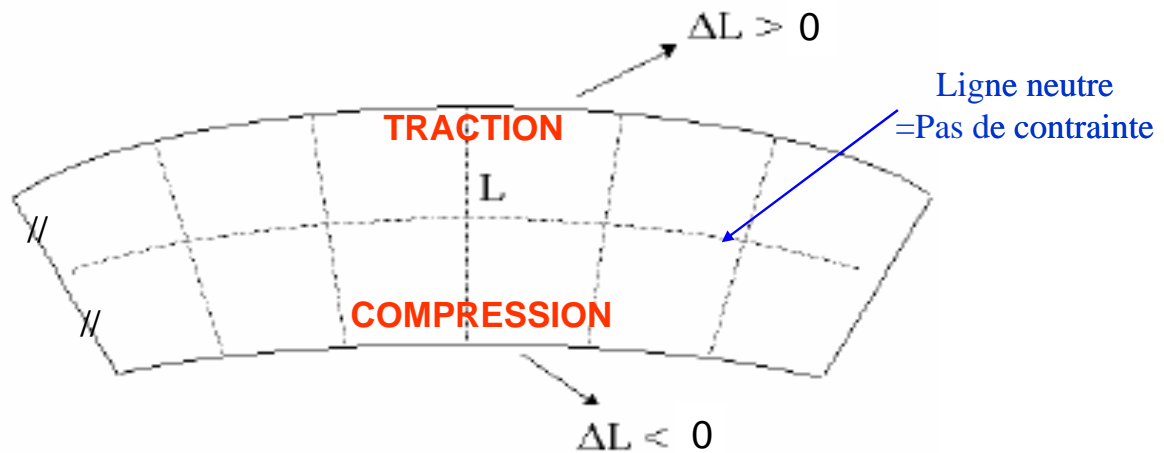


Figure 5 : Representation schématique des conséquences d'une force de flexion imposée à un os. La partie haute, sous traction, est allongée ($\Delta L > L$), et la partie basse, sous compression, est rétrécie ($\Delta L < L$).

D'autre part, il apparaît que l'adaptation osseuse à la contrainte mécanique se fait lors de contraintes dynamiques (cycliques), les contraintes statiques n'entraînant pas de réponse tissulaire (Lanyon and Rubin 1984). La réponse des cellules osseuses dépend de l'amplitude de la déformation mais aussi de sa fréquence, de son orientation, de sa distribution ou encore de sa durée (Torcasio, van Lenthe et al. 2008).

In vivo, lors de la locomotion, l'os est naturellement soumis aux contraintes mécaniques hautes amplitudes basses fréquences mais également aux faibles amplitudes hautes fréquences. Des jauges de déformation collées sur les membres de plusieurs espèces animales ont montré que le tissu osseux est soumis à de fortes déformations ($>1000\mu\epsilon$) seulement quelque fois par jour alors que de faibles déformations (10 à $100\mu\epsilon$) se produisent des milliers de fois (Turner, Yoshikawa et al. 1995; Fritton, McLeod et al. 2000), et ce quel que soit l'espèce et le site osseux étudié Figure 6.

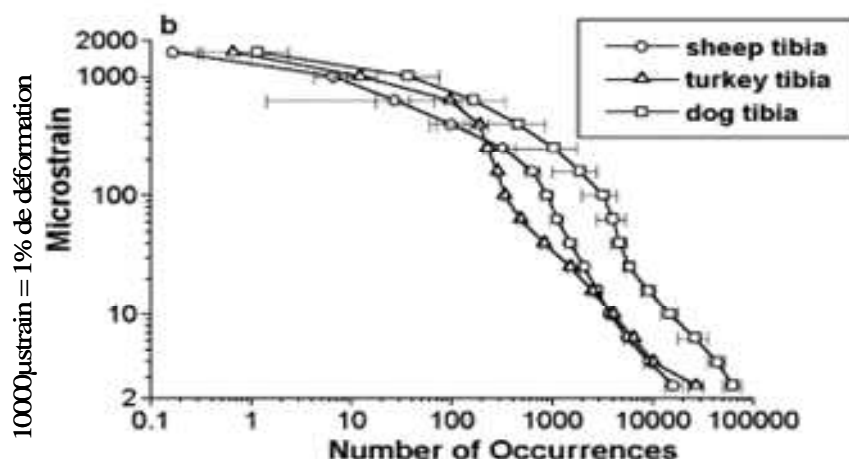


Figure 6 : Amplitude des déformations mesurées sur le tibia de différentes espèces en fonction de leur fréquence d'apparition durant une activité de locomotion journalière normale. D'après Fritton, McLeod et al. 2000

L'amplitude des plus fortes déformations peut atteindre 2000 $\mu\epsilon$ lors d'activités physiques intensives. Des amplitudes supérieures à 5000 $\mu\epsilon$ ont été mesurées dans certaines conditions extrêmes (chute) pouvant aboutir à des fractures osseuses. Au-delà de 3000 $\mu\epsilon$ les contraintes mécaniques sont dites supra physiologiques et pour une valeur supérieure à 5000 $\mu\epsilon$ les contraintes sont considérées comme délétères.

Plusieurs hypothèses ont été émises sur l'origine des signaux basse amplitude haute fréquence au niveau tissulaire. Les hautes fréquences observées auraient pu correspondre aux harmoniques des signaux basse fréquence, cependant, il a été montré chez l'homme que ces harmoniques n'excédaient pas 15 Hz (Antonsson and Mann 1985). Ces signaux pourraient aussi provenir de l'activité musculaire, car ils se produisent avant l'impact de la patte au sol chez le chien et le cheval. Midura (Midura, Dillman et al. 2005) a appliqué par électrostimulation des stimuli basses amplitudes hautes fréquences ce qui provoque une contraction musculaire induisant des déformations de l'ordre de 300 à 500 $\mu\epsilon$, 30Hz au niveau osseux. Il montre que cette stimulation permet de retarder l'apparition d'une ostéopénie chez le rat suspendu par la queue (modèle d'hypocontrainte).

I.1.3. Les propriétés électriques de l'os

Les champs électriques continus sont présents dans tous les tissus animaux pendant le développement ou durant les phases de régénération tissulaire. Leur existence et leur impact potentiel sur le développement et la réparation tissulaire sont encore mal connus et peu étudiés.

Lorsque l'os est soumis à des déformations mécaniques, il se crée une différence de potentiel et donc par définition un champ électrique (McDonald 1993; Spadaro 1997). Une hypothèse est de penser que cette création de charges est en partie responsable de l'activation du remodelage. Deux phénomènes sont capables de créer cette différence de potentiel au niveau du tissu osseux : les propriétés piézoélectriques de l'os et de l'un de ces principaux composant, le collagène, mais également les mouvements liquidiens contenant des molécules chargées (Gross and Williams 1982).

➤ Découverte de la piézoélectricité de l'os

La piézoélectricité (du grec piézein, presser) est la propriété que possèdent certains matériaux de se polariser électriquement sous l'action d'une contrainte mécanique et réciproquement de se déformer lorsqu'on leur applique un champ électrique. Le premier effet

est appelé effet piézoélectrique direct ; le second effet piézoélectrique inverse.

Fukada et Yasuda (Fukada 1957) sont les premiers à avoir démontré que le tissu osseux possède des caractéristiques piézoélectriques, il est capable de produire une polarisation électrique proportionnelle à la contrainte mécanique qui le déforme. De nombreux autres chercheurs ont également vérifié la piezoélectricité de l'os (Bassett and Becker 1962; Williams and Breger 1974; Korostoff 1979; Johnson, Williams et al. 1980). Au niveau des zones de pression se produisent des charges électronégatives, de courte durée, proportionnelles aux contraintes appliquées, alors qu'au niveau des zones de traction apparaissent des charges électropositives [Figure 7](#). La gamme de potentiels relevée au niveau d'un os non-contraint se situe entre 0.1 et 10mV. Une activité physique ordinaire produit des potentiels électriques de l'ordre de 20mV, dans les zones de compression, l'os peut développer des potentiels négatifs allant jusqu'à 100mV. Cependant, le degré de polarisation de l'os dépend de la fréquence, de l'amplitude et de la direction de la déformation. Le niveau de piézoélectricité varie, lui en fonction du degré d'humidité du tissu (Nowick 1975).

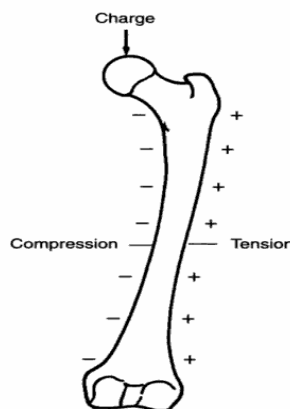


Figure 7 : Polarisation d'un fémur sous l'effet d'une déformation

Cette propriété de l'os a soulevé un grand intérêt à cette époque et Fukada et Yasuda ont alors émis l'hypothèse que les potentiels électriques pouvaient constituer des signaux contrôlant l'activité ostéoblastique et pouvaient ainsi jouer un rôle important dans la croissance osseuse et dans la réparation de l'os. Cependant, encore aujourd'hui, la signification physiologique de la piézoélectricité de l'os soulève de nombreuses questions et demandent encore des progrès scientifiques

➤ **Le collagène responsable de la piézoélectricité de l'os**

La partie organique de l'os est composée essentiellement de collagène, plusieurs expériences ont montré que les différences de potentiel relevées dans l'os ne sont pas dues au

contenu minéral de l'os mais sont largement dues aux propriétés du collagène. Otter et al. en 1988 (Otter, Goheen et al. 1988) ont fait des mesures du potentiel *Zeta* sur trois types d'échantillons : un os entier, un os déminéralisé (sans hydroxyapatite) et un os inorganique (sans collagène). Le potentiel *Zeta* ou potentiel d'écoulement représente la différence de potentiel électrique existant entre le nuage cationique entourant l'os (minéral ou collagène) et le milieu liquide environnant. Les potentiels *Zeta* de l'os entier et de l'os déminéralisé sont statistiquement identiques alors que celui de l'échantillon inorganique est très faible par rapport aux deux échantillons contenant du collagène. Ce faible potentiel *Zeta* trouvé dans les échantillons inorganiques est du même ordre de grandeur que celui calculé pour des hydroxyapatite synthétiques. Ainsi, les molécules de collagène, protéines fibreuses, répondent aux contraintes mécaniques par des manifestations piézoélectriques (Noris-Suarez, Lira-Olivares et al. 2007) : appliquer une force génère des potentiels locaux le long de la fibre de collagène. De plus, ils montrent que, sans ostéoblastes, les dipôles piezoélectriques créés par le collagène déformé sont capables d'induire la précipitation d'hydroxyapatite par des phénomènes électrochimiques. Ainsi, la piezoélectricité du collagène participe à la minéralisation. D'autre part, grâce aux progrès de la microscopie à force atomique (mesure de la réponse piezoélectrique d'échantillons biologiques à une échelle nanométrique), il a été possible de caractériser les propriétés électriques de la structure subfibrillaire des fibres de collagène (Minary-Jolandan and Yu 2009) ou celles d'une fibre isolée (Minary-Jolandan and Yu 2009). Ils montrent que la piezoélectricité de l'os est très hétérogène avec des « trous » sans propriétés piézoélectriques, cependant elle existe quand même au niveau des fibres de collagène enchâssées dans l'os. Ainsi, ces études récentes permettent d'apporter des précisions sur la piézoélectricité de l'os et d'avancer sur un sujet encore très peu étudié, la transduction mecanoélectrique dans l'os.

➤ Les potentiels de flux ou "streaming potentials"

La piezoélectricité du collagène pourrait influencer la dynamique des mouvements de fluides ioniques (« streaming potentials ») à l'intérieur des différents niveaux de confinement : porosité de la matrice, canalicules et les canaux de Haversian/Volkman. En effet, en changeant la charge de surface des fibres de collagène par une contrainte mécanique, la piezoélectricité du collagène pourrait influencer la valeur du potentiel *Zeta* et donc les potentiels de flux. Indirectement, ce phénomène jouerait aussi sur la dynamique des fluides dans l'os : le mouvement des charges ioniques contenues dans le fluide entraîne le fluide via les liaisons visqueuses (électro-osmose) (Ahn and Grodzinsky 2009).

Les zones de confinement où se produisent des mouvements de fluide sont situées dans l'os compact au niveau des ostéons ou systèmes de Havers. Les forces exercées sur l'os engendrent des mouvements de fluides ioniques à travers les canalicules, ce qui crée un mouvement de charges : les potentiels de flux. L'os étant formé de plusieurs couches de matrice concentriques, les différences de concentrations ioniques entre ces différentes couches impliquent des différences de potentiels à travers et le long de la surface osseuse. [Figure 8](#).

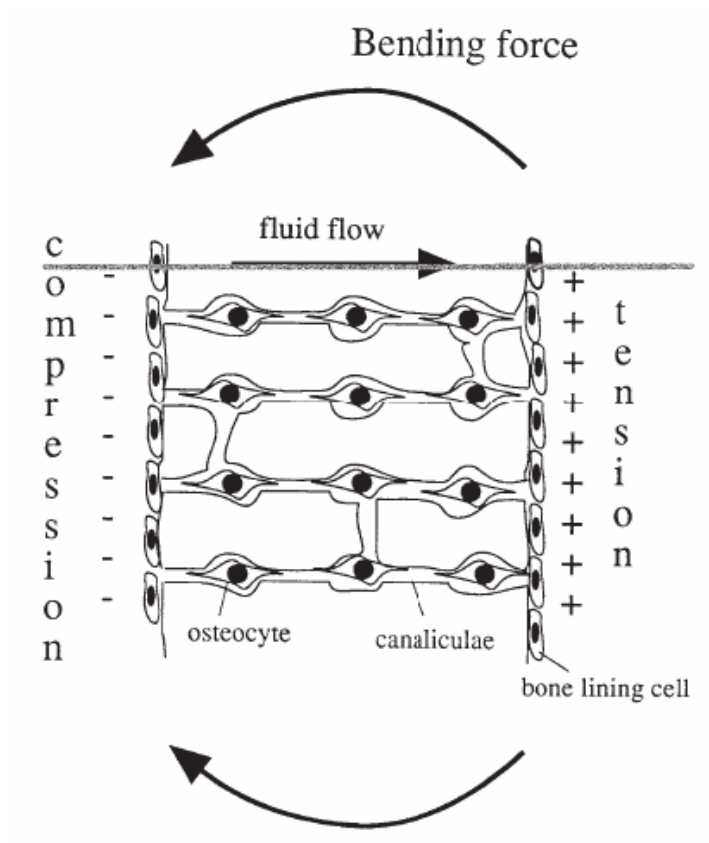


Figure 8 : Potentiels générés par les mouvements liquidiens dans les canalicules osseux (Turner and Pavalko 1998)

Les voltages mesurés autour des canaux de Havers sont 10 à 30 fois supérieurs à ceux mesurés pour l'os entier. Les valeurs mesurées dans les ostéons sont entre 20 et 50 V/m. Les voltages bioélectriques (ou différences de potentiels) produisent des densités de courant électrique de l'ordre de 0.5 à 12 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. On note que les zones de croissance active ou de réparation sont plus électronégatives que les zones moins actives. De plus, lorsque l'os est fracturé il devient entièrement chargé négativement et il est observé une valeur de voltage maximum au niveau du site fracture (Friedenberg and Smith 1969). Les courants électriques produits au niveau de la lésion ont des densités de l'ordre de 100 à 130 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ et les gradients de potentiels atteignent 10 à 50 mV/cm (Chakkalakal and Johnson 1981).

I.1.4. Les cellules osseuses et le remodelage osseux

Le tissu osseux est un système dynamique, qui est le siège d'un perpétuel remodelage: une fois la matrice osseuse mise en place, elle est constamment remodelée pour permettre sa cicatrisation et son adaptation aux contraintes mécaniques extérieures. Cette fonction, assurée par un couplage étroit entre les ostéoblastes et les ostéoclastes, est induite par un grand nombre de facteurs mécaniques et biochimiques.

➤Les ostéoclastes : effecteurs de la résorption osseuse

La cellule ostéoclastique est d'origine hématopoïétique. Elle dérive de la lignée médullaire monocytes-macrophages. La différenciation de prémonocytes en précurseurs ostéoclastiques se déroule dans la moëlle osseuse sous le contrôle des ostéoblastes. Les ostéoclastes sont situés à la surface du tissu osseux en voie de résorption. Ce sont de grandes cellules post-mitotiques (100µm) plurinucléées, issues de la fusion des préostéoclastes. Elles sont polarisées, le pôle basal est en contact avec l'os, elles résorbent le tissu osseux ancien. Leur membrane présente un plissement (ruffled border) qui offre une grande surface d'échange. Le cytosol est chargé de nombreuses vésicules et lysosomes avec un contenu lytique (phosphatase tartrate résistante, cathepsine K, collagénase et des metalloprotéases).

➤Les ostéoblastes : effecteurs de la formation osseuse

Les ostéoblastes sont des cellules qui dérivent de cellules mésenchymateuses du stroma médullaire. Ce sont des cellules de morphologie cuboïdale dont le corps cellulaire est polarisé avec un noyau situé au pôle basal. Ils sont rencontrés en surface du tissu osseux en croissance, leur fonction est de synthétiser la matrice osseuse collagénique et d'autres protéines non collagéniques, ils participent également à la minéralisation. Ce sont des cellules mononuclées de 20 à 50µm attachées et alignées sur l'ostéoïde [Figure 9](#). Elles sont riches en organites témoins de l'importance des synthèses protéiques (collagène en particulier) et mucopolysaccharidiques. De plus, ces cellules contiennent une concentration élevée d'enzymes dont les phosphatases alcalines qui interviennent dans le déclenchement et l'entretien de la minéralisation de la substance pré-osseuse.

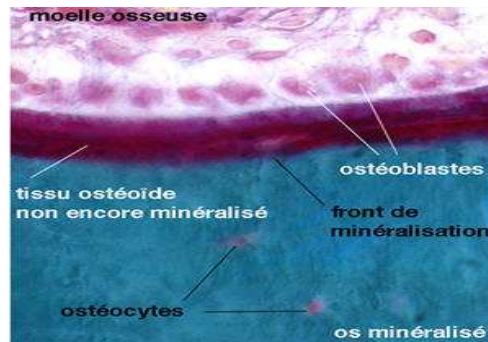


Figure 9 : L'ostéoblaste produit la matrice ostéoïde puis la minéralise
 (<http://dossier.univ-st-etienne.fr/lbto/www/tissu-osseux/index.html> Dr Lafage-Proust)

Une fois que l'ostéoblaste a terminé de déposer le tissu ostéoïde il peut subir l'apoptose ou évoluer vers deux types cellulaires distincts.

Lorsque l'ostéoblaste est emmuré dans la matrice minéralisée il devient alors un ostéocyte, dans 10 à 20% des cas. L'ostéocyte, situé dans une loge ovale ou ostéoplaste, est relié à ses congénères et aux cellules de la surface de la travée osseuse par tout un réseau de canalicules dans lesquels l'ostéocyte émet de fins prolongements, formant un véritable syncytium. Il est reconnu que, bien que l'ostéocyte ait un niveau d'activité métabolique bien inférieur à celui de l'ostéoblaste, il est capable de synthétiser du collagène qui se minéralise secondairement. Par ailleurs, du fait de sa situation privilégiée dans le tissu osseux, il joue un rôle dans la transmission des variations de contraintes mécaniques appliquées au tissu osseux et qui influencent son métabolisme. Lorsque l'ostéoblaste se transforme en ostéocyte, plusieurs marqueurs tels que la sclérostine, un inhibiteur de la minéralisation et la dentine matrix protéine (Dmp1), un régulateur de la minéralisation, augmentent. Le fait que ces molécules aient clairement un rôle dans la minéralisation et qu'elles soient fortement exprimées chez les ostéocytes signifie que ces cellules peuvent réguler la minéralisation (van Bezooijen, Roelen et al. 2004) (Toyosawa, Shintani et al. 2001). Plusieurs marqueurs ostéocytaires pourraient contrôler le métabolisme du phosphate notamment à travers le facteur phosphaturique FGF23 (fibroblast growth factor 23). En effet la sécrétion de FGF23 est stimulée en cas d'hyperphosphatémie et entraîne une phosphaturie (Liu, Zhou et al. 2008). Depuis peu, le système lacunocanalaire des ostéocytes est vu sous l'angle d'un organe endocrinien car la majeure partie de cette hormone proviendrait des ostéocytes (Quarles 2008).

L'ostéoblaste peut aussi s'aplatir et avoir une activité métabolique très réduite, il devient alors une cellule bordante. Chez l'adulte, seules 15% des surfaces trabéculaires sont recouvertes d'ostéoblastes actifs. Le reste des surfaces osseuses est recouvert par les cellules bordantes séparant l'espace osseux de l'espace médullaire. Ces cellules bordantes n'ont pas

d'activité de synthèse, néanmoins, il est actuellement admis qu'elles sont capables, sous l'influence de stimuli, de se multiplier et de se redifférencier en ostéoblastes actifs. La place de ce pool de réserve dans le métabolisme osseux est encore mal comprise.

➤ **Le remodelage du tissu osseux**

Le remodelage est le fait de l'activité coordonnée d'équipes de cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques qui constituent des "unités fonctionnelles de remodelage" (*Dufour M 2007.*), dont le travail (résorption puis formation de la matrice) aboutit à la formation d'un ostéon dans l'os cortical, et d'un demi ostéon à la surface trabéculaire. Une unité fonctionnelle de remodelage progresse dans l'os, avec les ostéoclastes à l'avant, et les ostéoblastes à l'arrière, en forant un cylindre de résorption dans l'os cortical (ou un demi cylindre dans l'os trabéculaire). D'autre part, la vascularisation osseuse est un acteur important du remodelage. L'activité des cellules osseuses consomme de l'oxygène qui est apporté par le vaisseau. De plus, le vaisseau apporte localement les cellules précurseurs des ostéoclastes et certains précurseurs des ostéoblastes que l'on appelle les péricytes (*Fei 2006*).

L'os est formé de millions d'unités fonctionnelles de remodelage. La durée d'un cycle de remodelage est d'environ quatre mois chez l'adulte, et est influencée par des facteurs de différentes natures (PTH, vitamine D, contraintes mécaniques, champs électriques...).

I.2. La matrice osseuse

La matrice du tissu osseux combine trois caractéristiques qui lui donnent sa spécificité : les éléments entrant dans sa composition, le caractère ordonné de son organisation et sa minéralisation.

La matrice extracellulaire (MEC) occupe entre 92 et 95 % du volume tissulaire et peut être subdivisée en matrice organique (22 %) et inorganique (69 %). La teneur en eau, environ 9%, est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation. L'ostéoblaste synthétise la phase organique composée essentiellement de collagène de type I et des protéines non collagéniques suivie de la phase minérale constituée essentiellement par des cristaux phosphocalciques d'hydroxyapatite.

I.2.1. La phase organique

Les composants fondamentaux de la matrice organique de l'os sont déposés par les

ostéoblastes au cours de la phase active de leur existence. La matrice organique forme ce que l'on appelle l'ostéoïde ou substance préosseuse. Les principales classes de macromolécules qui la composent forment la substance fibrillaire (90 %) contenant des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine) ainsi que la substance interfibrillaire (10 %) englobant des protéoglycanes et de petites protéines non collagéniques. La mise en place de la matrice osseuse primaire a été décrite *in vitro*, et ces travaux ont mis en évidence une séquence au cours de laquelle la composition et l'état de la matrice d'une part, et l'état de différenciation et l'expression phénotypique des cellules ostéoblastiques d'autre part sont en régulation réciproque (Malaval 2008).

➤Le collagène

La famille des collagènes compte au moins 27 membres (Ricard-Blum and Ruggiero 2005). La matrice osseuse organique est composée à environ 90% de collagène, principalement de type I, mais aussi V et XXIV. Le collagène de type I est une glycoprotéine fibreuse rigide en forme de tresse à trois brins d'une longueur de 3000Å et de 50Å de diamètre, riche en proline et hydroxyproline. Le collagène de type I est synthétisé au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux de l'ostéoblaste sous la forme de tropocollagène (constitué de trois sous unités 2 chaînes alpha1 et une chaîne alpha 2, « triple hélice ») ensuite agencé en microfibrilles puis en fibrilles. Ce réseau fibreux caractéristique favorise la minéralisation par la fixation sur les fibres de collagène, de cristaux d'hydroxyapatite qui confèrent sa dureté au tissu osseux. Dans l'os lamellaire, les fibrilles sont organisées en feuillets où elles sont parallèles entre elles mais perpendiculaires aux fibrilles des plans directement adjacents. C'est l'orientation des fibrilles de collagène qui confère à l'os la capacité de résister aux forces de traction et compression. Les fibres de collagène sont stabilisées par des pontages, au sein des molécules mais aussi entre elles, par voie enzymatique et non-enzymatique. Ces pontages contribuent aux propriétés mécaniques de la trame matricielle, et donc du squelette, indépendamment du degré de minéralisation (Garnero, Borel et al. 2006). Ils constituent aussi, après libération de peptides par destruction de la matrice au cours de la résorption ostéoclastique, des marqueurs circulants du remodelage osseux (Garnero 2000).

➤Les protéines non collagéniques

La phase organique de la matrice contient des protéines non collagéniques (10%-15% du contenu protéique osseux) dont un quart provient de la circulation sanguine et est stocké dans l'os. Ces protéines matricielles ont divers rôles qui ne sont pas complètement connus.

La fibronectine (Fn)

La Fn, une protéine matricielle ubiquitaire impliquée dans de nombreux processus tissulaires tels que l'embryogénèse, l'angiogénèse, ou encore les phénomènes d'inflammation et de cicatrisation. La Fn circulante, originaire du foie, constituerait la majeure partie de la matrice osseuse. Cette Fn circulante aurait un rôle dans la minéralisation et les propriétés mécaniques de la matrice osseuse mais n'affecterait pas le nombre et la fonction des cellules osseuses (Bentmann, Kawelke et al. 2009). Cette notion supporte le fait que les propriétés mécaniques de la matrice peuvent être affectées sans qu'il n'y ait eu d'effets sur les fonctions ostéoblastiques. Cependant, c'est bien la Fn synthétisée par les ostéoblastes qui exerce un contrôle sur la prolifération et les fonctions ostéoblastiques. Le "masquage" de la Fn par des anticorps inhibe la différenciation ultérieure des ostéoblastes (Moursi, Damsky et al. 1996; Moursi, Globus et al. 1997).

La polymérisation du collagène dépendante de la fibronectine

Dans l'os, la fibrillogénèse de la Fn précède celle du collagène dans la séquence du dépôt de l'os primaire, le réseau de Fn servira de "patron" à la mise en place ultérieure des fibres de collagène (Mao and Schwarzbauer 2005). L'organisation du réseau de collagène est difficilement observable, c'est donc souvent l'observation des fibres de Fn qui nous donne un aperçu de l'organisation générale de la matrice. Il a été montré que sans Fn, des fibroblastes sont incapables d'organiser le réseau de collagène de type I et III. L'addition de Fn, rapidement assemblée en un réseau fibrillaire, suffit à promouvoir la fibrillogénèse des deux types de collagène (Velling, Risteli et al. 2002). La Fn est indispensable non seulement lors des étapes initiales de la polymérisation du collagène mais sa présence continue est également indispensable pour maintenir l'intégrité de la MEC. En effet, Sottile et al. (Sottile and Hocking 2002) montrent que l'inhibition de la polymérisation de la Fn désorganise les fibres de Fn déjà présentent alors que la présence continue de Fn soluble dans le milieu de culture va stabiliser le réseau préexistant.

Ainsi, l'organisation du réseau de Fn au sein de la matrice extracellulaire osseuse est donc un paramètre capital, puisque sans Fn, les ostéoblastes ne peuvent pas déposer de collagène, et donc pas synthétiser de minéral.

Structure de la fibronectine

La Fn est une protéine d'adhésion de 440 à 500 kDa. Elle est en fait constituée de deux monomères liés entre eux par un pont disulfure. Chaque sous-unité monomérique comprend des domaines d'autoassemblage, des domaines capables d'interactions avec les protéines matricielles et des récepteurs de type intégrine localisés à la surface des cellules (Geiger, Bershadsky et al. 2001) [Figure 10](#).

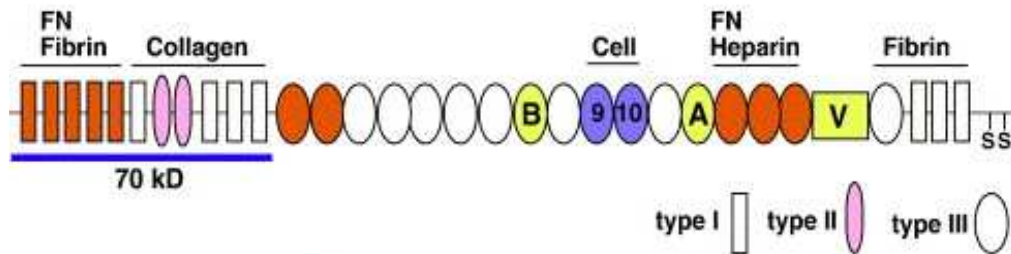


Figure 10 : Structure du monomère de fibronectine (Mao and Schwarzbauer 2005)

La Fn est constituée de 12 modules de type I (rectangles), 2 modules de type II (ovales roses) et 15 à 17 modules de type III (ovales). Les domaines d'épissage correspondent aux régions IIIB, IIIA et V (jaunes). Les domaines de liaison à la fibrine, au collagène, aux cellules et à l'héparine sont indiqués. Les domaines de liaison aux cellules (ovales violets) contiennent les modules III10 (avec la séquence RGD) et III9. Les sites d'interaction FN-FN incluent les domaines II-5, III1-2 et III12-14 (rouges).

La fibrillogénèse

La Fn est en partie synthétisée par les ostéoblastes puis excrétée dans le milieu extracellulaire. La molécule de Fn se trouve alors sous forme soluble et dans une conformation dite compacte en raison de nombreux repliements intramoléculaires localisés en partie sur le domaine type III (Baneyx, Baugh et al. 2002; Oberhauser, Badilla-Fernandez et al. 2002). Cette organisation compacte de la Fn a pour conséquence de masquer certains sites d'interactions de la molécule tels que les types I et II. Cependant, les sites de types III contenant des peptides RGD (Arg-Gly-Asp) sont libres d'interagir avec les cellules environnantes. La fixation des cellules sur la molécule de Fn s'effectue via les récepteurs $\alpha 5 \beta 1$ intégrines (en jaunes [Figure 11A](#)) faisant partie intégrante des contacts focaux. Pour permettre le contact avec la molécule de Fn, les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ vont alors transloquer du contact focal au cytosquelette cellulaire ([Figure 11B](#) traits verts) et plus précisément aux filaments d'actine par l'intermédiaire de la tensine. Ce processus appelé « activation » va entraîner une signalisation intracellulaire [Figure 11B](#) et un recrutement important d'autres récepteurs intégriniques de manière à former des clusters d'intégrines $\alpha 5 \beta 1$ qui grâce à la tensine sont capables de se déplacer le long des filaments d'actine puis vont générer des tensions qui auront pour conséquence le déroulement de la molécule de Fn et permettront de démasquer d'autres sites d'interactions tels que les types 1 et 2 (Pankov, Cukierman et al. 2000).

L'accessibilité aux sites de types 1 va permettre de former des contacts fibrillaires, les molécules de Fn vont se lier entre elles afin de former des fibrilles [Figure 11C](#). L'alignement des molécules de Fn peut varier selon les interactions possibles entre les différents domaines (I_{1-5} peut se lier à III_{1-2} ou bien à III_{12-14}). La migration cellulaire le long des molécules de Fn va permettre l'allongement de ses fibrilles, on parle de phase d'élongation (Schwarzbauer and Sechler 1999). La Fn organisée en fibrilles est insoluble.

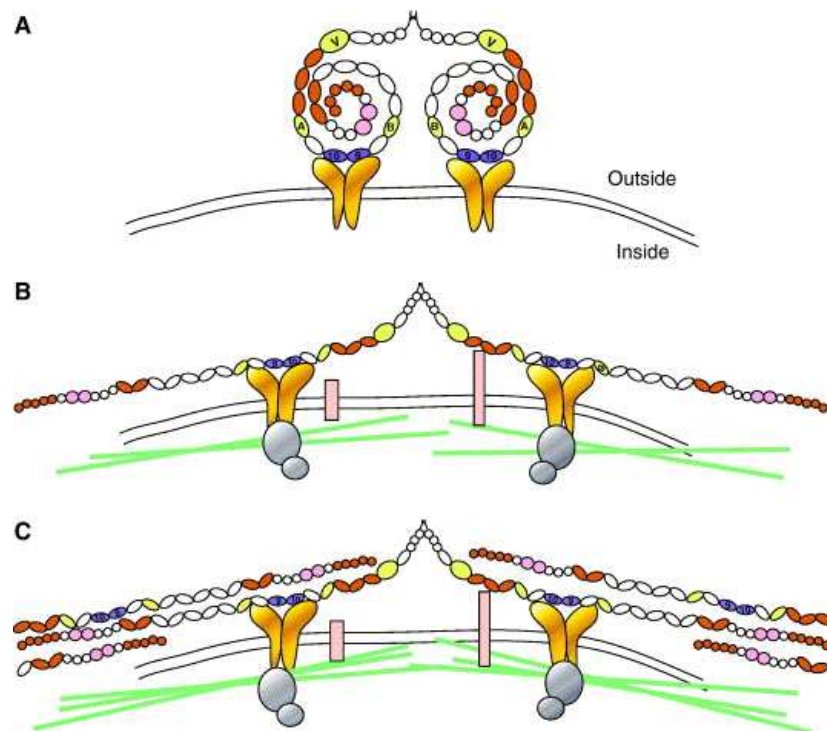


Figure 11 : Les grandes étapes de la fibrillogénèse d'après (Mao and Schwarzbauer 2005)

La contractilité cellulaire influence les changements conformationnels de la Fn ce qui peut entraîner l'exposition de certains domaines protéiques (Zhong, Chrzanowska-Wodnicka et al. 1998). Des travaux (Baneyx, Baugh et al. 2002) ont démontré que l'adhésion cellulaire et l'application de forces mécaniques extérieures sont capables de modifier l'organisation des molécules de Fn (fibrillogénèse). L'organisation du réseau de Fn au sein de la matrice extracellulaire osseuse semble donc être un paramètre capital.

La famille des SIBLING ("Small, Integrin Binding Ligand N-linked Glycoproteins")

Sur la base des données actuelles, et pour le tissu osseux, la famille des SIBLING (Fisher and Fedarko 2003) peut être scindée en deux groupes de niveaux fonctionnels différents. D'un côté, la « Dentin Matrix Protein 1 » (DMP-1) et la « Matrix Extracellular

Protein » (MEPE) MEPE qui jouent des rôles majeurs dans la régulation de la minéralisation, et du métabolisme du phosphore (Quarles 2008). De l'autre, l'ostéopontine (OPN) et la «Bone Sialoprotein» (BSP) qui jouent également un rôle dans la minéralisation, mais ont surtout une importance cruciale dans les interactions cellule/matrice, et par conséquent dans la fonctionnalité des ostéoblastes (Malaval 2008).

L'ostéopontine ou sialoprotéine osseuse I (OPN)

C'est une phosphoglycoprotéine très ubiquitaire qui est aussi exprimée par les ostéoblastes différenciés. C'est une protéine d'adhérence car elle possède une séquence consensus RGD (Arg-Gly-Asp) de liaison aux intégrines ainsi qu'un domaine contenant une séquence d'acide aspartique qui lui conférerait son affinité pour l'hydroxyapatite (Goldberg, Warner et al. 2001). Sa synthèse est stimulée par la vitamine D et le TGF β 1. Elle intervient dans la phase d'ancrage des ostéoblastes à la matrice osseuse minéralisée. Son degré de phosphorylation pourrait moduler la mobilité des ostéoblastes à la surface de la matrice. Elle se lie au récepteur intégrinique α v β 3 par le motif RGD. Elle est également rattachée à de nombreuses molécules extracellulaires comme le collagène de type I, la fibronectine et l'ostéocalcine. L'ostéopontine est une protéine mécanosensible; lors d'un stress mécanique, elle permet la médiation du signal aux ostéoblastes (Ishijima, Rittling et al. 2001). Cependant, cette fonction reste encore mal connue. Morinobu (Morinobu, Ishijima et al. 2003) a montré *in vivo* que l'expression de l'ostéopontine augmente lors de la formation du tissu osseux et que cette protéine serait un des facteurs positifs jouant un rôle dans la formation osseuse sous contrainte mécanique. Les souris déficientes en OPN (OPN $^{-/-}$) ne présentent pas d'anomalies morphologiques majeures de l'os. Cependant, il a été montré qu'elles sont résistantes à la perte osseuse induite par l'ovariectomie (Yoshitake, Rittling et al. 1999) et l'immobilisation (Ishijima, Tsuji et al. 2002). Les souris OPN $^{-/-}$ présentent aussi une hyperminéralisation, et leur croisement avec les souris PAL $^{-/-}$ compense en partie l'ostéomalacie induite par la perte de l'activité phosphatasique, ce qui confirme que l'OPN est un inhibiteur physiologique de la minéralisation de la matrice osseuse (Harmey, Johnson et al. 2006).

La sialoprotéine osseuse II (BSP)

C'est une protéine d'environ 33kDa qui possède deux domaines poly-glutamate. La Sialoprotéine osseuse (BSP) a été isolée dans l'os cortical en 1968 par Herring et Ken (Herring 1968), et a été la première protéine non collagénique à être étudiée de façon très approfondie depuis les années 1980. Considérée comme un marqueur de la différenciation ostéoblastique, la

BSP est produite par les ostéoblastes mais également par les ostéoclastes, les ostéocytes et les chondrocytes hypertrophiques. Comme la plupart des protéines de la matrice osseuse, la BSP possède un domaine d'affinité au collagène de type I (Tye, Hunter et al. 2005). On sait qu'elle est fortement présente dans les tissus minéralisés (dentine, ciment, tissus calcifiés), et qu'elle joue un rôle crucial dans l'adhésion cellulaire, puisqu'elle est capable à la fois de se lier à l'hydroxyapatite et à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Zhang, Tu et al. 2009). La BSP est capable d'induire la formation d'hydroxyapatite *in vitro* (Harris, Rattray et al. 2000) et posséderait ainsi un rôle dans la nucléation et la minéralisation *in vivo*. In vitro, la Sialoprotéine osseuse favorise également la migration sur matrice de collagène de cellules stromales de la moelle (Karadag and Fisher 2006). La BSP, tout comme l'OPN est un gène de réponse rapide aux contraintes mécaniques (Carvalho, Bumann et al. 2002). Les souris BSP^{-/-} sont viables, fertiles et ont un développement normal, bien qu'elles soient de poids et de taille plus petits que les individus sauvages. Malgré leur faible activité de remodelage, les souris BSP^{-/-} perdent de l'os de la même façon que les sauvages après suspension par la queue, ce qui distingue ce phénotype de celui des souris OPN^{-/-} (Malaval, Wade-Gueye et al. 2008).

➤ Les autres protéines non collagéniques

L'ostéocalcine ou BGP (Bone Gla Protein) représente 15 à 25 % des protéines non collagéniques de l'os. Synthétisée par les ostéoblastes, c'est une protéine spécifique du tissu osseux, vitamine K-dépendante. La vitamine K est un cofacteur de l'enzyme γ -glutamyl carboxylase qui permet la carboxylation des résidus acides glutamiques (Gla) sur de nombreuses protéines dont l'ostéocalcine. L'ostéocalcine est carboxylée post-traductionnellement sur trois résidus Gla par le système γ -carboxylase au niveau du réticulum endoplasmique. Ceci confère à l'ostéocalcine des propriétés d'affinité au minéral d'hydroxyapatite et pourrait être un inhibiteur de la calcification osseuse. En effet, la délétion génique de l'ostéocalcine induit, chez la souris, une augmentation de la formation osseuse (Ducy, Desbois et al. 1996). D'autre part, elle attire et active les ostéoclastes et joue donc un rôle dans le renouvellement osseux. Elle semble avoir un rôle chimiotactique pour les ostéoclastes et favoriser l'adhésion et l'étalement de ces cellules. L'ostéocalcine joue un rôle important dans le remodelage osseux. 30% de l'ostéocalcine synthétisée n'est pas incorporée dans la matrice osseuse. Le taux circulant d'une fraction de cette protéine non incorporée est utilisé comme indice de formation osseuse (Binkley and Suttie 1995).

L'ostéonectine intervient dans la minéralisation par son affinité pour le collagène de

type I et (dans certaines espèces) pour l'hydroxyapatite. *In vitro*, elle apparaît comme un modulateur de l'adhésion cellulaire, dont l'adjonction à des cellules en culture entraîne la perte des contacts focaux sans détachement, conduisant à un état «d'adhérence intermédiaire», favorisant, par exemple, la migration (Murphy-Ullrich 2001).

On trouve aussi des glycosaminoglycanes/protéoglycanes qui sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées. La décorine et le biglycan, par exemple, jouent un rôle dans l'agencement des molécules de collagène lors de leurs organisations secondaire et tertiaire.

I.2.2. Matrice et facteurs de croissance

Plusieurs facteurs de croissance sont d'importants régulateurs du recrutement, de la différenciation et de la fonction de l'ostéoblaste (Marie 2008). Les facteurs les plus importants sont produits par les ostéoblastes eux-mêmes et s'incorporent dans la matrice osseuse.

➤ Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF)

Le VEGF-A est le facteur proangiogénique le plus ubiquitaire observé sur les sites d'angiogénèse et dont sa concentration est corrélée avec la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins [Figure 12](#).

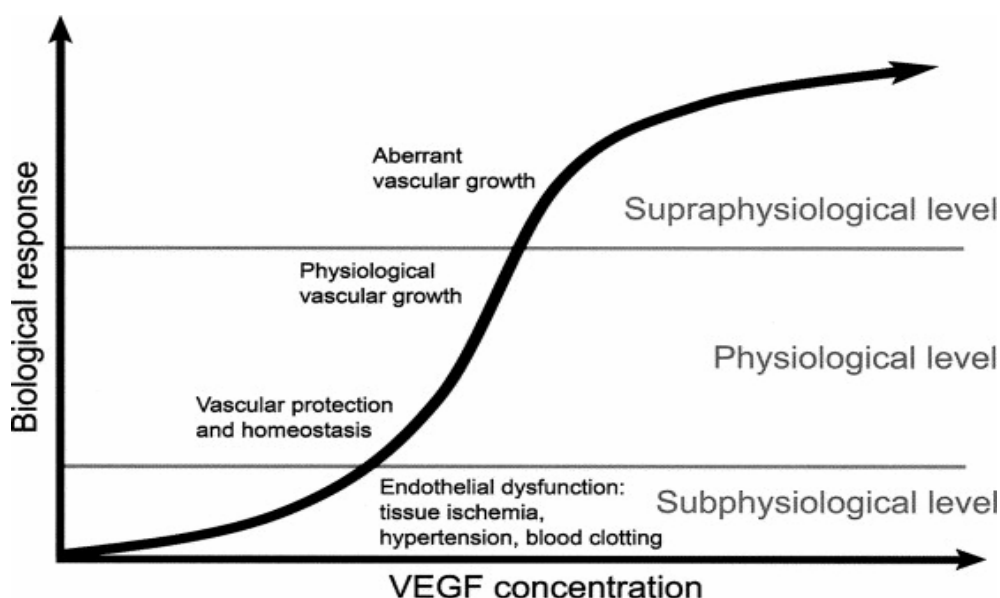


Figure 12 : Résumé succinct des effets du VEGFA en fonction de sa concentration (Yla-Herttuala, Rissanen et al. 2007)

Une concentration trop faible en VEGF-A entraîne un dysfonctionnement de l'endothélium via une réduction de la production de NO et des prostacyclines. Un niveau physiologiquement faible maintient l'homéostasie et la protection des structures vasculaires,

alors que des concentrations plus élevées induisent une expansion vasculaire accompagnée d'une angiogénèse bourgeonnante et d'un élargissement capillaire modéré. A un niveau supraphysiologique, le VEGFA induit une croissance vasculaire aberrante, la formation de lacunes sanguines et une hyperméabilité vasculaire conduisant à des oedèmes tissulaires (Yla-Herttuala, Rissanen et al. 2007). Ainsi, en médecine régénérative, le greffage du VEGF sur des substituts osseux doit être étroitement contrôlé afin de respecter des concentrations physiologiques. Il paraît plus prudent de travailler avec des stimulations physiques qui vont activer la production naturelle de VEGF cellulaire.

Les ostéoblastes expriment trois isoformes majeures du VEGF A (VEGF121, 165 et 189 pour les isoformes humaines). Le VEGF121 est sous forme soluble, le VEGF189 rattaché à l'héparine est incorporé dans la matrice extracellulaire, le VEGF165 est lié à la matrice mais existe aussi sous forme soluble. Le VEGFR1 (ou fms-like tyrosine kinase receptor/Flt-1) et le VEGFR2 (ou KDR : kinase-insert-domain-receptor) sont les deux récepteurs à haute affinité pour le VEGF qui font partie de la sous famille des récepteurs tyrosine kinases.

In vitro, le VEGF est produit par les ostéoblastes et stimule la différenciation ostéoblastique (Deckers, Karperien et al. 2000; Mayer, Bertram et al. 2005; Orlandini, Spreafico et al. 2006). Dans des cultures ostéoblastiques, l'expression des isoformes du VEGF est modulée par la contrainte mécanique (Faure, Linossier et al. 2008; Dumas, Perrier et al. 2009). Plusieurs cytokines et facteurs de croissance augmentent l'ARNm du VEGF ou induisent le relargage du VEGF notamment le PGDF, le TNF α , le TGF- β (Pertovaara, Kaipainen et al. 1994), le bFGF (Brogi, Wu et al. 1994), l'EGF, l'IL-1 α ou encore l'IGF1. Parmi ces facteurs, beaucoup n'ont pas d'effet angiogénique direct mais agissent via le VEGF.

In vivo, le VEGF induit la perméabilité micro vasculaire et joue un rôle central dans la régulation de l'angiogénèse et la vasculogénèse (Kaigler, Wang et al. 2006) (Amoroso, Del Porto et al. 1997) (Park, Keller et al. 1993). Le gain osseux lié à l'exercice physique est complètement bloqué par des antagonistes du VEGF (Yao, Lafage-Proust et al. 2004). Chez la souris l'invalidation du VEGF inhibe l'angiogénèse et la formation osseuse (Zelzer, McLean et al. 2002). Inversement, « l'hypoxia inducible growth factor α » (HIF α) augmente l'angiogénèse, l'ostéogénèse et la masse osseuse en stimulant l'expression du VEGF dans les ostéoblastes chez la souris (Wang, Wan et al. 2007; Wan, Gilbert et al. 2008).

➤ Transforming growth factor- β (TGF β)

La matrice de l'os constitue le lieu de stockage du TGF β le plus abondant de l'organisme. Le TGF β est un facteur local fondamental dans le contrôle de l'ostéogénèse. Il

stimule la formation osseuse, la prolifération des pré-ostéoblastes ainsi que la production de collagène de type I et d'ostéopontine. Il inhibe la dégradation de la matrice en bloquant l'activité collagénase (Manolagas 2000). Le TGF β 2 module la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices du stroma médullaire en agissant de façon séquentielle avec la BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2), le premier en stimulant la prolifération des progéniteurs stromaux et le deuxième leur différenciation en ostéoblastes (Fromigue, Marie et al. 1998). Enfin, il a également un effet anti apoptotique sur les ostéoblastes (Dufour, Holy et al. 2007).

➤ **Fibroblast Growth Factors (FGFs)**

Les facteurs de croissance de type FGFs forment une famille de polypeptides de petite taille qui comptent 23 membres (Mirams, Robinson et al. 2004). Certains ont été montrés comme agissant sur l'os : FGF2, 4, 18, 9 (Marie, Debais et al. 2002; Marie 2003). Quatre récepteurs de haute affinité véhiculent leurs effets. Les facteurs FGFs sont synthétisés par les ostéoblastes et sont capables de s'associer aux protéoglycanes, au collagène et à la fibronectine de la matrice osseuse (Canalis, McCarthy et al. 1988). Ce sont des régulateurs importants de la prolifération et de la différenciation des ostéoblastes (Walsh, Jefferiss et al. 2000; Xiao, Jiang et al. 2002), FGF9 et 18 (Xiao, Naganawa et al. 2004).

➤ **Insulin-like Growth Factors: IGF-I et IGF-II**

Les IGFs sont produits dans de nombreux tissus comme le muscle, les tissus nerveux, lymphoïdes, endothéliaux, reproducteurs et osseux. Dans l'os, les IGFs sont des régulateurs importants du tissu osseux (Baker, Liu et al. 1993), ils sont synthétisés par les cellules ostéoblastiques. In vitro, les IGF-I et II stimulent la prolifération des cellules ostéoblastiques et augmente la synthèse de collagène (Marie 1994). Leurs effets sont modulés par des protéines porteuses, les IGF-BPs (IGF-Binding proteins, au nombre de 6) (Schmid, Schlapfer et al. 1992) qui les séquestrent dans la matrice extracellulaire et ainsi empêche leur liaison aux récepteurs. Il existe en contre partie diverses IGFBP-protéases destinées à libérer les facteurs IGFs de la MEC. L'IGF-I jouerait un rôle dans la réparation osseuse, car après fracture, son expression est augmentée dans l'os néoformé (Rosen 2004). La régulation du système IGF est très complexe, elle fait intervenir de nombreux facteurs de croissances dont le TGF β et les FGFs.

➤ **Les autres facteurs de croissance**

D'autres facteurs de croissance jouent des rôles locaux dans la régulation de

l'ostéoformation. Les BMPs contrôlent toutes les étapes de la formation osseuse, en augmentant le recrutement des cellules ostéoprogénitrices, la différenciation des cellules ostéoblastiques et en régulant leur durée de vie (Chen, Zhao et al. 2004; Gaggero and Canalis 2006). Les prostaglandines sont connues pour stimuler la formation osseuse in vitro et in vivo (Raisz 1999), en particulier la PGE2 stimule la différenciation des ostéoblastes in vitro de manière dose dépendante (Scutt and Bertram 1995). Nous pouvons également citer le platelet derived growth factor (PDGF) connu pour stimuler la prolifération des ostéoblastes in vitro (Abdennagy, Hott et al. 1992) ou encore l'epidermal growth factor (EGF) qui augmente la formation osseuse chez la souris (Marie, Hott et al. 1990).

Ce chapitre n'est pas exhaustif, il cite principales molécules présentes dans la matrice organique et celles qui ont été étudiées dans cette thèse. De nouveaux facteurs sont identifiés dans la matrice osseuse chaque année.

I.2.3. La phase minérale

La phase minérale est constituée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite de calcium de formule générale $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ qui ont la forme de petites aiguilles de 600 Å de longueur conférant à l'os sa solidité. La calcification de la matrice se fait par l'intermédiaire des vésicules matricielles qui sont des vésicules émises par l'ostéoblaste ou le chondrocyte hypertrophique dans la matrice cartilagineuse et contenant de fortes concentrations de phosphatase alcaline et de minéraux. Cependant, dans le processus de minéralisation du tissu osseux lamellaire, les vésicules matricielles n'ont jamais été visualisées. Les noyaux d'hydroxyapatite sont dans un premier temps localisés dans les lacunes des microfibrilles de collagène (phénomène de nucléation) où environ 70% du minéral est déposé. Puis le cristal grossit (croissance cristalline) et comble l'espace disponible. Enfin la calcification s'étend à l'espace interfibrillaire, cette dernière phase durant plus longtemps. L'interface entre matrice organique collagénique et matrice minérale est assurée par les protéines non collagéniques dont la composition favorise l'amorce du processus de nucléation.

I.2.4. Les interactions MEC-ostéoblastes et MEC-CSMs

Les adhésions des cellules aux protéines de la MEC jouent un rôle primordial dans les voies de signalisation intra et inter-cellulaire impliqués dans de nombreux processus

physiologiques. Ces sites d'adhésions sont des structures complexes composées de plusieurs protéines d'ancrages et de signalisation. Il existe quatre types d'adhésion cellule-matrice : les complexes focaux ($<3\mu\text{m}$), les adhésions focales ($2-5\mu\text{m}$), les adhésions fibrillaires ($1-10\mu\text{m}$) (déjà évoquées précédemment dans le paragraphe fibronectine) et les adhésions cellule-matrice 3D [Figure 13](#). Elles se distinguent notamment par leur taille, leur composition, leur organisation et leur fonction.

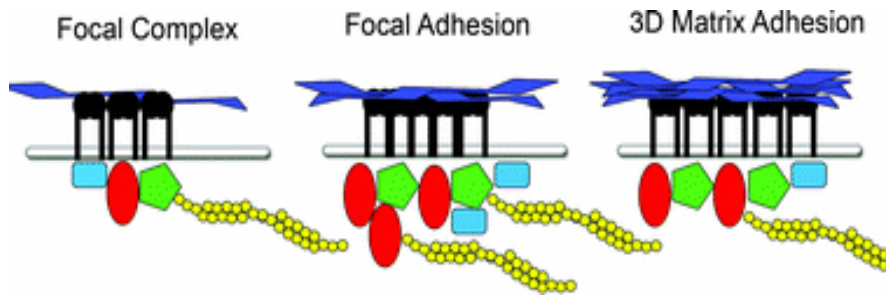


Figure 13 :Les interactions MEC-ostéoblastes d'après (Harjanto and Zaman)

➤La plaque d'adhésion focale

Lors du processus d'adhésion des cellules ostéoblastiques, la formation de ces points de contacts focaux permet d'établir un pont entre la MEC et le cytosquelette. Ces ponts moléculaires se composent donc de regroupements d'intégrines (cluster) localisés au niveau transmembranaire associés à un complexe protéique intracytoplasmique appelé contact focal lui-même relié aux filaments d'actine du cytosquelette [Figure 14](#).

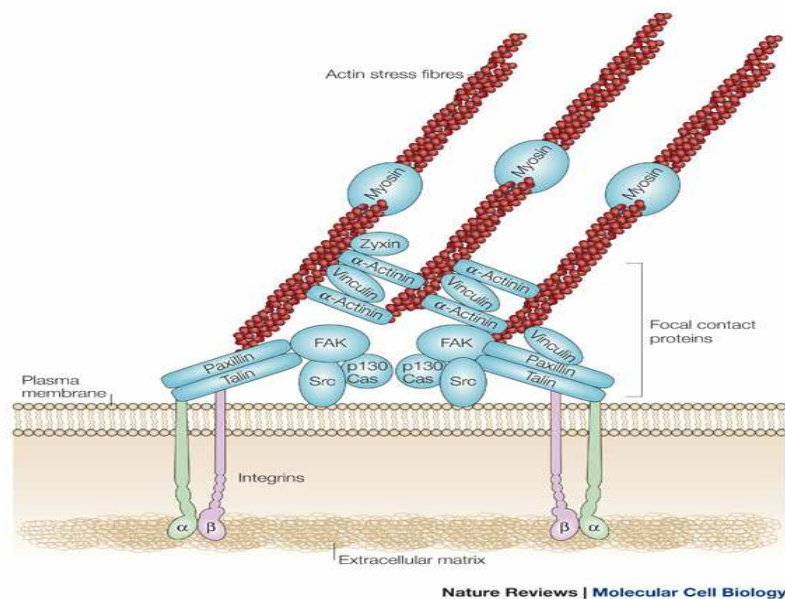


Figure 14 : La liaison des intégrines à la MEC est suivie de leur regroupement et de leur interaction avec le cytosquelette via la plaque d'adhésion focale (Mitra, Hanson et al. 2005)

Les intégrines sont responsables de l'attachement de la cellule à la MEC par liaison à de nombreux ligands dont le collagène, la laminine, la vitronectine et la fibronectine (Hynes 2002). Les intégrines activées se connectent ainsi avec des molécules de signalisation intracellulaires dont des protéines adaptatrices (Taline, Vinculine....) et des protéines à tyrosine kinases (Sarcoma Rous Aviae (src), Focal Adhésion Kinase (FAK)...), provoquant la réorganisation du cytosquelette et la formation de fibres de stress (Boutahar, Guignandon et al. 2004).

Parmi les protéines adaptatrices on trouve :

- La taline assurant un lien direct entre les intégrines et la vinculine,
- la vinculine : protéine la plus représentée du contact focal qui permet la stabilisation des interactions taline-actine, la stimulation de la polymérisation de l'actine et la maturation du contact focal,
- l' α -actinine qui assure un lien entre les filaments d'actine et la vinculine,

L'attachement des cellules à la MEC crée une boucle de régulation positive avec des agrégations moléculaires de plus en plus importantes par un recrutement des intégrines activées, des adaptateurs et des kinases intracellulaires (Giancotti and Ruoslahti 1999). Ces interactions supramoléculaires engendrent, en aval, des signaux intracellulaires activateurs de cascades effectrices (Brakebusch and Fassler 2003). Les contacts cellules-matrice peuvent contrôler la différenciation, la fonction et la durée de vie des cellules. Le développement des adhésions cellule-matrice est affecté par de nombreux facteurs incluant les propriétés de la MEC tels que sa dimension (2D, 3D), sa rigidité et les forces qu'elle génère sur les sites d'adhésion.

➤La matrice, un microenvironnement 3D : son influence sur la différenciation des progéniteurs mésenchymateux.

Les cellules souches mésenchymateuses sont situées *in vivo* dans un microenvironnement 3D spécifique, ces niches apportent des stimulations structurelles, biochimiques et mécaniques qui sont nécessaires aux fonctionnements de ces cellules. Cependant, les mécanismes spaciaux et temporels qui gouvernent le comportement des CSMs sont encore peu connus. Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, plusieurs études récentes montrent l'intérêt de mimer ce microenvironnement afin de mieux contrôler la différenciation des CSMs (Lund, Yener et al. 2009). La plupart des études qui essaient de reproduire ce microenvironnement 3D séparent les composantes biochimiques des paramètres mécaniques, *in*

vivo ces deux facteurs sont pourtant couplés. Par exemple, les études de Dalby (Dalby, Gadegaard et al. 2007) sur l'influence de la topographie ne prennent en compte que l'environnement mécanique. A l'inverse, d'autres études (Salaszyk, Williams et al. 2004; Klees, Salaszyk et al. 2005) analysent uniquement les effets d'un « coating » d'une ou plusieurs protéines matricielles sur la différenciation des CSMs. Ainsi, il n'est pas encore possible de recréer synthétiquement toutes les subtilités du microenvironnement naturel des cellules.

En attendant de réussir à reconstruire une niche cellulaire *in vitro*, des études récentes utilisent des matrices extracellulaires récoltées sur des tissus ou produites *in vitro*. Ces MEC sont decellularisées puis utilisées comme substrats pour les CSMs. Zhang et al (Zhang, He et al. 2009) ont travaillé avec des matrices acellulaires provenant de divers tissus (peau, muscle et foie), ils ont utilisé ces matrices pour « coater » des boîtes de culture cellulaire. Les types cellulaires issus de ces 3 tissus ont ensuite étéensemencés sur les matrices. Chaque type cellulaire possède une meilleure prolifération et différenciation lorsqu'il est cultivé sur la matrice de son tissu d'origine. Les auteurs n'ont pas analysé les différences de composition entre les 3 types de matrices, celles-ci sont certainement très subtiles mais permettent d'apporter le microenvironnement adapté et nécessaire à chaque type cellulaire. La MEC est donc un microenvironnement très spécifique et dans une perspective d'ingénierie tissulaire, ces matrices decellularisées pourraient être optimisées dans le but de développer des systèmes de culture de régénération tissulaire. De manière similaire, Datta et al. (Datta, Holtorf et al. 2005; Datta, Pham et al. 2006) ont utilisé une MEC produite *in vitro* par des CSMs en conditions ostéogéniques. Après decellularisation, cette matrice induit la différenciation ostéoblastique (augmentation de l'activité PAL et de la minéralisation) des CSMs nouvellement ensemencées. Cette étude se place dans une optique d'ingénierie tissulaire puisque les matrices sont produites sur les mèches de titane.

Ainsi, le simple contrôle du microenvironnement cellulaire pourrait guider la prolifération et la différenciation cellulaire, ceci permettrait de s'affranchir des suppléments chimiques nécessaires pour induire une différenciation.

I.3. Réponses du tissu osseux aux contraintes mécaniques

I.3.1. Généralités

L'architecture du tissu osseux est modifiée de façon continue (Frost 1987;

Sommerfeldt and Rubin 2001). Le remaniement osseux est induit par des facteurs endogènes ou exogènes. Dans cette étude, nous nous sommes notamment intéressés à la contrainte mécanique qui affecte l'activité des cellules osseuses.

La contrainte mécanique, par son augmentation ou sa diminution, affecte l'activité des cellules osseuses qui va elle-même affecter la microarchitecture et la qualité osseuses et donc la capacité de résistance de l'os à la fracture. Les cellules orchestrant la réponse osseuse tissulaire à la contrainte sont les cellules de la lignée ostéoblastique. Afin de mieux appréhender les effets des contraintes mécaniques sur la masse et l'architecture du tissu osseux, Frost (Frost 1987) a élaboré en 1987 le concept du mécanostat [Figure 15](#).

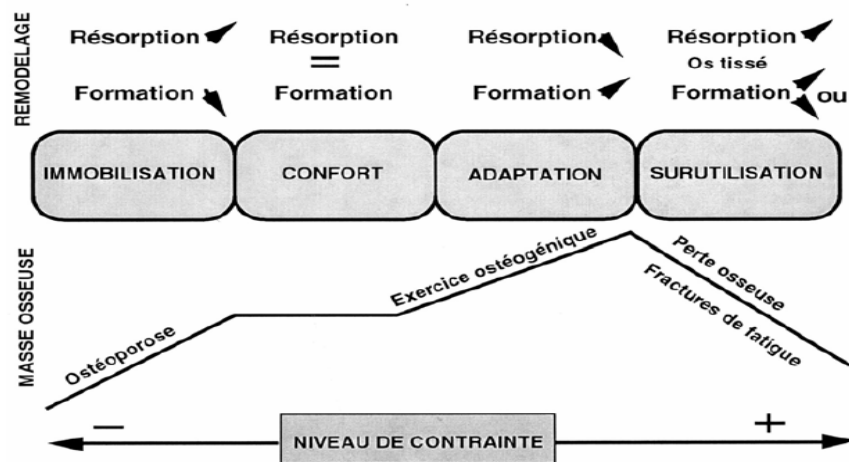


Figure 15 : Le mécanostat selon Frost. (D'après Lafage-Proust et Coll, 1999).

Ce mécanisme adaptatif est décrit comme une réception du signal mécanique, une transformation de ce signal mécanique en signal moléculaire et une action des cellules effectrices. Au niveau tissulaire, une activité physique appropriée permet d'augmenter la masse osseuse et/ou d'améliorer son architecture trabéculaire. Ces modifications s'accompagnent d'une augmentation de la formation osseuse et d'une diminution de la résorption osseuse. Inversement, une diminution de ces contraintes engendre une perte osseuse associée à une diminution de la formation osseuse. Chez l'homme, lors d'aliments prolongés ou en microgravité (voyage spatial, le squelette n'est soumis à aucune force), on observe une perte osseuse au niveau des os porteurs (membres inférieurs) (Vico, Collet et al. 2000). Les modèles de microgravité simulée comme celui du rat suspendu par la queue présente une perte osseuse et un changement dans l'architecture de l'os trabéculaire (Baiotto, Labat et al. 2009).

La théorie de Frost est basée sur l'amplitude des contraintes mécaniques cependant elle ne tient pas compte de leur fréquence [Figure 16](#).

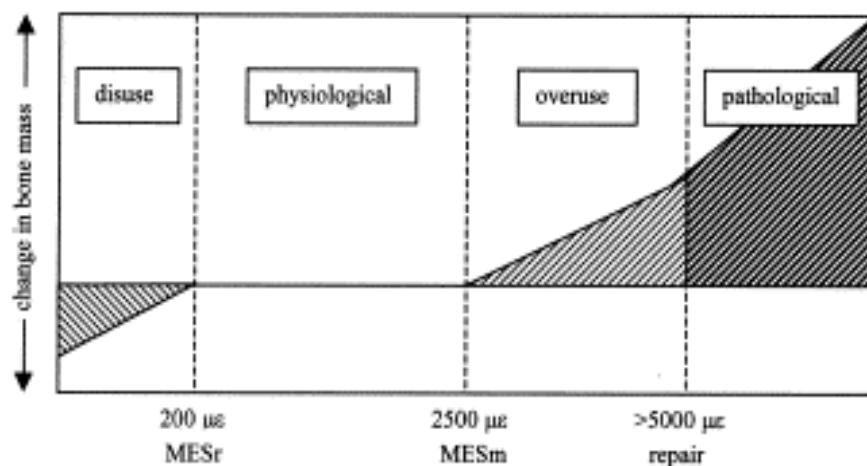


Figure 16 : Théorie du mécanostat selon Frost d'après (Basso and Heersche 2002)

I.3.2. Les effets de l'activité physique sur le tissu osseux

La contrainte mécanique induite par l'activité physique est un signal indispensable au maintien d'une bonne résistance osseuse.

A partir de trois semaines d'exercice volontaire dans une roue, il se produit chez le rat une augmentation significative du volume osseux (Holy and Zerath 2000). Chez ces rats coureurs, on note une élévation de la phosphatase alcaline et des paramètres de formation osseuse dès la première semaine. L'effet direct des contraintes mécaniques est toutefois difficile à cerner de part les différentes modifications physiologiques (système cardiovasculaire, ventilation, métabolisme, hormones) entraînées par la pratique d'un sport et susceptibles de modifier la réponse osseuse.

Pour les sports à raquette (tennis, squash), l'augmentation du contenu minéral osseux (BMC) se restreint aux sites osseux contraints (augmentation de 12,18% pour le bras dominant par rapport au bras non dominant) (Kannus, Haapasalo et al. 1995). D'autres exercices physiques ne montrent en revanche aucun effet ostéogénique; une étude portant sur des athlètes de différentes disciplines (triathlètes, nageurs, cyclistes) montre que seuls les triathlètes ont une BMD (densité minérale osseuse) plus importante que les individus contrôles (Maimoun, Mariano-Goulart et al. 2004). Il semblerait donc que deux catégories d'exercices se distinguent: les sports ostéogènes et les sports non ostéogènes. Les caractéristiques ostéogéniques de l'exercice physique se retrouvent en fait dans les "sports à impacts", aux sites osseux où les contraintes mécaniques agissent.

I.3.3. Les effets des basses amplitudes hautes fréquences sur le tissu osseux

Encore récemment, on pensait que seules les contraintes mécaniques de hautes amplitudes ($>2000\mu\epsilon$) basses fréquences ($<3\text{Hz}$) similaires à la contrainte induite par des activités physiques rigoureuses avec impact étaient capables d'induire une réponse ostéogénique. Pourtant, les signaux de basses amplitudes ($<300\mu\epsilon$) hautes fréquences ($>10\text{Hz}$) peuvent également conduire à une réponse ostéogénique. Ainsi, une force appliquée à haute fréquence (10-20Hz) est plus ostéogène que la même force appliquée à plus basse fréquence (1Hz) (Rubin and McLeod 1994; Hsieh and Turner 2001). Les contraintes mécaniques basses amplitudes au niveau du tissu osseux étant prépondérantes durant les activités journalières (Fritton, McLeod et al. 2000), de nouvelles études ont mis en évidence leurs effets sur le tissu osseux (Prisby, Lafage-Proust et al. 2008; Judex, Gupta et al. 2009). Des brebis placées sur table vibrante fournissant un stimulus à haute fréquence (30Hz) et basse amplitude ($< 10\mu\epsilon$) montrent qu'un gain osseux de 34,2 % peut être acquis sur l'os trabéculaire du fémur proximal après un an de séance quotidienne (à raison de 20 minutes par jour) (Rubin, Turner et al. 2001). (Judex, Boyd et al. 2003) avec un protocole similaire constate que ce signal mécanique a augmenté la rigidité de l'os et la force nécessaire à sa fracture dans l'axe d'application du stimulus par rapport aux brebis qui n'ont pas reçu de contraintes. Bien que ces changements soient restreints au compartiment trabéculaire, ces données montrent que ce type de stimuli non invasif constitue un avenir pour le traitement de l'ostéoporose. Par ailleurs, un signal simulant l'activité physique, type locomotion (signal sinusoïdal, 3N, 2Hz), couplé à des signaux de basses amplitudes (0.3N), hautes fréquences (0-50Hz) appliqués sur 2 jours consécutifs (30s/j) sur des ulna murin in vivo, a été montré comme augmentant le taux de formation osseuse d'environ 4 fois par rapport au signal de simulation d'exercice physique seul (Tanaka, Alam et al. 2003). Ainsi, un signal vibratoire (type « bruit ») ajouté à un signal sinusoïdal standard augmente la formation osseuse. Nous pouvons remarquer que dans cette étude l'amplitude des signaux est exprimée en Newton ce qui nous permet juste de raisonner en relatif : l'amplitude des signaux vibratoires est dix fois plus faible que celle de la sinusoïdale porteuse. Ne connaissant pas la surface sur laquelle est appliquée cette force, nous ne pouvons traduire cette amplitude en pression ni même en déformation.

Deux modèles de perte osseuse montrent que le potentiel ostéogénique des signaux basses amplitudes hautes fréquences existe aussi dans des cas de déséquilibre du métabolisme osseux, et peut restaurer l'équilibre perdu. Dans un modèle de rat suspendu par la queue (décharge du train arrière), un signal à 90Hz, $10\mu\epsilon$, appliqué 10 minutes par jour pendant 4

semaines prévient la perte osseuse (Rubin, Xu et al. 2001). Des signaux de 45Hz, 5 μ s appliqués 30 minutes par jour pendant 90 jours à des rates ovariectomisées inhibent la résorption endocorticale et le déclin des propriétés mécaniques de l'os dû à l'ovariectomie. Ces signaux ont également un effet sur le compartiment cortical, la formation osseuse périostée est augmentée par rapport aux rates ovariectomisées non stimulées ou aux contrôles (Oxlund, Ortoft et al. 2003).

Chez l'humain, de récentes études cliniques montrent l'intérêt de ce type de régime mécanique, notamment pour les sujets fragiles (personnes âgées, handicapés) qui ne peuvent pratiquer un exercice physique de manière régulière. Chez les femmes ménopausées, deux études montrent que des séances (<20min 3j/semaine) sur table vibrante (20-90Hz) durant 6 à 12 mois montrent un gain osseux aux sites lombaire et fémoral et une augmentation de la force musculaire (Rubin, Recker et al. 2004; Verschueren, Roelants et al. 2004). Cependant, ces études ont été effectuées sur de faibles effectifs et ne permettent pas encore de conclure formellement.

I.4 Réponses du tissu osseux aux stimulations électriques exogènes

I.4.1. L'Histoire

Après que Yasuda ait découvert ce qu'il a appelé « l'effet piézoélectrique de l'os », convaincu de son influence sur le remodelage osseux, il a émis l'hypothèse qu'une stimulation électrique exogène pourrait améliorer la formation osseuse. Il a implanté deux électrodes dans le fémur d'un lapin et montré, qu'après 3 semaines, un début de cal osseux s'était développé entre les deux électrodes et plus spécifiquement, au voisinage de la cathode (Yasuda 1955). Pour lui ce fut la confirmation que la stimulation électrique jouait un rôle dans la formation osseuse. D'autres équipes confirment cette découverte (Bassett, Pawluk et al. 1964), un faible courant électrique appliqué directement dans l'os augmente la formation osseuse autour de la cathode mais va aussi la diminuer autour de l'anode. La croissance osseuse est optimale pour des courants de l'ordre de 5 à 20 μ A. En dessous de 5 μ A, la formation osseuse n'est pas améliorée et au dessus de 20 μ A le tissu osseux se nécrose. Ces résultats semblaient en accord avec les valeurs de courant relevées au niveau d'un site de fracture et son électronégativité. Certains ont alors suggéré (Ferrier, Ross et al. 1986) que les ostéoblastes seraient attirés par les charges électronégatives et les ostéoclastes par les charges électropositives. De ces recherches

sont nés « les stimulateurs de croissance osseuse », outils destinés à améliorer la réparation osseuse.

I.4.2. La stimulation électrique : un traitement pour la réparation fracturaire

Dans les années 1980, la stimulation électrique a été établie comme étant une modalité de traitement des fractures (nonunions) (Alexa 1996; Yonemori, Matsunaga et al. 1996; Akai, Shirasaki et al. 1997; Brighton 1981). Depuis, ces stimulateurs sont prescrits en supplément pour améliorer le processus de réparation fracturaire (Ciombor and Aaron 2005). Il existe 3 modes d'utilisation : le mode invasif où les deux électrodes sont implantées au niveau du site fracturaire, le mode semi-invasif où seule la cathode est implantée, l'anode est placée sur la peau, enfin le mode capacitif où les deux électrodes sont situées sur la peau de part et d'autre de la fracture. Ce dernier mode est aujourd'hui le plus utilisé car il présente de nombreux avantages : pas de chirurgie, pas de risque d'infection et il est moins coûteux. Initialement, ces méthodes accélérant la formation osseuse étaient utilisées uniquement avec des courants électriques continus. Actuellement, différentes formes de stimulations sont utilisées : électriques en modes alternatifs, pulsés, capacitifs ou encore des champs électromagnétiques (Abeed, Naseer et al. 1998; Otter, McLeod et al. 1998; Aaron, Ciombor et al. 2006; Gan and Glazer 2006). Les stimulations électriques sont essentiellement utilisées pour améliorer la réparation fracturaire, une recherche récente montre qu'elles auraient aussi un intérêt pour pallier la perte osseuse : une stimulation électrique exogène appliquée sur des ratte a permis de contrer la perte osseuse due à l'ovariectomie (Lirani-Galvao, Chavassieux et al. 2009).

Les techniques de stimulation électrique ont prouvé leur efficacité pour l'amélioration de la réparation fracturaire, cependant on connaît très peu de chose sur la transduction du signal qui entraîne la réponse physiologique de l'os. Pour utiliser des méthodes de stimulations appropriées et éviter des effets secondaires, il est important de comprendre comment l'électricité interagit avec l'os et quels sont les effets d'un changement d'environnement électrique à l'échelle cellulaire.

II. LA CULTURE DE CELLULES OSTEOBLASTIQUES

II.1. Le phénotype ostéoblastique

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) humaines ou murines sont capables, *in vitro*, sous certaines conditions, de s'engager dans une voie de différenciation bien déterminée (ostéogénique, chondrogénique, adipogénique ou encore myocytaire) et de montrer des caractéristiques fonctionnelles du tissu correspondant.

La différenciation des CSMs en ostéoblastes a été démontrée en présence d'agents inducteurs comme la dexaméthasone. *In vitro* la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, induit l'expression des gènes du phénotype ostéoblastique sur des cultures de cellules humaines du stroma médullaire ou d'ostéoblastes (Kimoto, Cheng et al. 1994; Fromiguet, Marie et al. 1997). Elle exerce un effet différenciateur sur les progéniteurs ostéoblastiques (Leboy, Beresford et al. 1991) avec un effet stimulateur sur l'activité de l'ALP accompagné d'un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (Kim, Cheng et al. 1999). On sait aujourd'hui qu'une régulation fine et complexe, orchestrée par de nombreux facteurs de transcription contrôle les différentes étapes du processus différenciateur de l'ostéoblaste (Marie 2008). Ces facteurs répondent aux sollicitations multiples du microenvironnement et des facteurs systémiques qui contrôlent le destin ostéoblastique des CSMs. Le facteur Runx2 est un facteur de transcription qui a un rôle majeur dans la régulation de l'engagement des CSMs dans la voie ostéoblastique et le maintien de la fonction ostéoblastique au cours de la croissance post natale. Son rôle a été clairement démontré dans des modèles d'inactivation *in vivo*. Une délétion homozygote de Runx2 conduit à une absence d'ossification membranaire ou enchondrale avec un arrêt de la maturation des ostéoblastes (Komori, Yagi et al. 1997; Otto, Kanegane et al. 2002). Runx2 exerce son activité transcriptionnelle par liaison au promoteur de gènes cibles au niveau d'une séquence consensus OSE2 (Osteoblast specific cis-acting element) (Ducy and Karsenty 1995). Cette séquence OSE2 est retrouvée sur les promoteurs de gènes qui caractérisent le phénotype ostéoblastique dont le collagène de type 1, l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine osseuse. Runx2 est activé par phosphorylation. Cette phosphorylation est directement corrélée à sa capacité de transactivation des promoteurs de ces gènes cibles via la voie des MAPKs (Xiao, Jiang et al. 2002), (Franceschi and Xiao 2003).

La maturation de l'ostéoblaste est caractérisée par l'induction de gènes associés à la production de matrice extracellulaire dont la phosphatase alcaline, le collagène de type 1 et les

protéines de structure non collagéniques (précocement l'ostéopontine et plus tardivement la sialoprotéine osseuse (Aubin, Liu et al. 1995; Fromigue, Marie et al. 1997). La séquence d'acquisition de ces marqueurs est donnée sur la [Figure 17](#) (Stein, Lian et al. 2004).

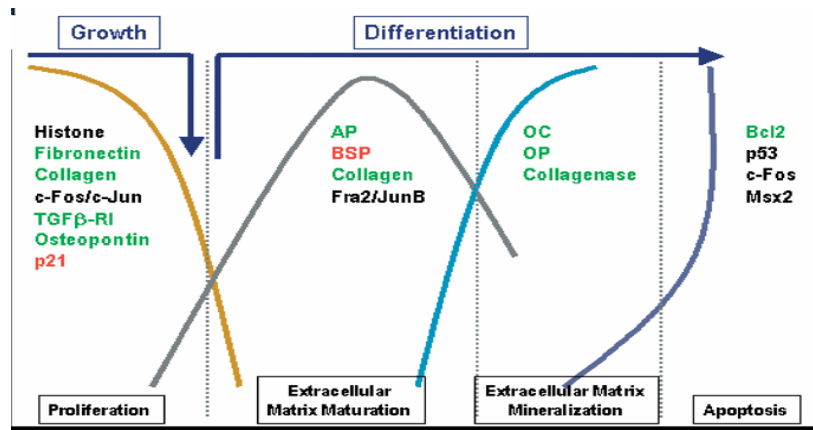


Figure 17 : Expression séquentielle des marqueurs de différenciation par les cellules ostéoblastiques (Stein, Lian et al. 2004)

II.2. Les modèles cellulaires

Les travaux *in vitro* visant à déterminer les effets des contraintes mécaniques sur le comportement ostéoblastique ont nécessité l'utilisation diverses lignées cellulaires possédant chacune un certain potentiel de différenciation ostéoblastique. Je détaillerai uniquement les caractéristiques des modèles cellulaires utilisés dans cette thèse, 4 types cellulaires qui retracent l'engagement ou l'avancement dans le lignage ostéoblastique : les C3H10T1/2 (modèle de progéniteurs mésenchymateux), les MC3T3-E1 (modèle préostéoblastique), les MG63 (modèle ostéoblastique) et les cellules ostéoblastiques primaires.

II.2.1. Progéniteurs mésenchymateux : Les C3H10T1/2

L'utilisation de modèles de progéniteurs mésenchymateux provenant de cellules embryonnaires a permis une étude détaillée des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'engagement des cellules vers une voie de différenciation et la mise en évidence de facteurs impliqués dans leur régulation. Les cellules C3H/10T1/2, clone 8 ont été isolées par C. Reznikoff et coll. en 1973 (Reznikoff, Brankow et al. 1973) à partir d'une lignée de cellules embryonnaires de souris de C3H. Ces cellules sont un bon modèle d'étude *in vitro* avec un potentiel de différenciation comparable aux cellules souches mesenchymateuses murines

(Zhao, Li et al. 2009). *In vitro*, dans un milieu ostéogénique, le potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses et des C3H10T1/2 vers la voie ostéoblastique est similaire : ces cellules affichent une coloration PAL positive et une augmentation des ARNm de Runx2, du collagène de type I, et de l'ostéocalcine. Les cellules souches mésenchymateuses et les C3H10T1/2 induisent d'ailleurs une formation osseuse similaire dans un biomatériau. De la même manière, sous induction chondrogénique, les deux types cellulaires forment des tissus cartilagineux avec les composants matriciels spécifiques du cartilage (des protéoglycanes, du collagène de type II et des aggrécanes). En revanche, sous induction adipogénique, les C3H10T1/2 présentent un potentiel de différenciation adipogénique moins important (diminution de PPAR γ 2 et des globules lipidiques) que les cellules souches mésenchymateuses après 5-10 jours de culture

II.2.2. Pré-ostéoblastes : Les MC3T3-E1

Les MC3T3-E1 permettent d'étudier spécifiquement la différenciation ostéoblastique, pour comprendre ce qu'il se passe en amont, c'est-à-dire l'engagement cellulaire vers une voie de différenciation. Ces cellules proviennent de calvaria murin, elles ont été immortalisées par introduction de l'antigène T du virus SV-40 (Sudo, 1983). Il existe des différences phénotypiques dans cette lignée, c'est pourquoi on retrouve la commercialisation de différents sous-clones. Quarles (Quarles, Yohay et al. 1992) et al. ont décrit la différenciation de ce clone. Durant la phase initiale de développement, soit avant la confluence, les cellules se répliquent activement mais conservent une apparence fusiforme, n'expriment pas la PAL et n'accumulent pas de MEC minéralisée. Ces données correspondent au stade ostéoblastes immatures, on dit que les MC3T3-E1 sont des « pré » ostéoblastes. Lorsque les cellules sont à l'état de confluence, elles présentent une morphologie cuboïdale et diminuent leur activité de prolifération. En revanche, elles augmentent l'expression de certaines fonctions ostéoblastiques telles que la production de PAL, la transformation du procollagène en collagène et la déposition d'MEC. La minéralisation de l'ECM débute autour du 16ème jour de culture, ce qui marque la dernière phase du développement du phénotype ostéoblastique. L'expression de la PAL et la minéralisation sont des phénomènes « temps » dépendants mais non « densité » dépendants. La synthèse du collagène de type I et l'accumulation du collagène sont deux actions indépendantes, non-couplées, lors du développement du phénotype ostéoblastique. Bien que la synthèse et l'expression du collagène présentent un pic à 3 jours de culture chez des cellules immatures, l'accumulation de MEC est encore minimale. L'accumulation de la matrice est maximum à partir de 7 jours de culture, c'est un processus relatif aux ostéoblastes

matures. L'ascorbate et le beta-glycerol phosphate sont tous deux essentiels pour l'expression du phénotype ostéoblastique (PAL et minéralisation). L'ascorbate ne stimule pas l'expression du collagène de type I chez les MC3T3E1 mais est indispensable pour la déposition du collagène dans la MEC. L'ascorbate augmente l'activité de la PAL des cellules matures mais n'affecte pas celles des cellules immatures. Le beta-glycerol phosphate a des actions synergiques avec l'ascorbate mais sa présence est surtout indispensable lors du processus de minéralisation.

Les MC3T3-E1 produisent une MEC abondante et présentent une expression séquentielle, temps dépendante, des caractéristiques ostéoblastiques. Ainsi, elles sont un modèle utile pour les études portant sur la MEC ou celles concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans la maturation des ostéoblastes.

II.2.3. Les ostéoblastes : Les MG63

Les MG63 sont les cellules d'origine ostéosarcomateuse (Billiau, 1977) issues de tumeurs malignes osseuses cependant elles prolifèrent en monocouche et présentent un phénotype normal. Elles sont largement utilisées en particulier dans le champ des biomatériaux, d'une part en raison de leur taux de prolifération élevé et d'autre part pour leur phénotype stable. Ces cellules sont sensibles aux contraintes mécaniques (Faure, 2008) et notamment à des régimes de faibles amplitudes (Di Palma, 2004).

II.2.4. Les ostéoblastes primaires humains

Chez l'Homme, les cellules ostéoblastiques primaires sont issues de biopsie osseuse au cours de chirurgie (prothèse totale de hanche, chirurgie traumatique chez l'enfant). Des fragments d'os trabéculaire d'environ 3mm X 3mm sont découpés et rincer plusieurs fois dans du PBS (phosphate buffered saline) afin d'éliminer les cellules sanguines et les débris. Les fragments sont ensuite placés dans un milieu de culture complet et cultivés dans un incubateur (37°C, 5% CO₂). Les cellules sont récoltées quelques jours plus tard. En culture conventionnelle sur plastique la différenciation et la minéralisation sont obtenues si les cellules sont cultivées en présence de milieu supplémenté avec 10 mM d'acide ascorbique, 10 mM de β -glycerophosphate et 1 μ M de dexaméthasone

Les cellules primaires représentent le meilleur modèle pour étudier la réponse ostéoblastique cependant leur disponibilité est restreinte. Le nombre de cellules provenant d'un même donneur est limité et pourtant il est nécessaire pour la même expérimentation de

travailler avec le même pool de cellules afin d'éviter les problèmes de variabilité inter-donneurs affectant par exemple la capacité de prolifération et de différenciation.

Bien que les cellules issues de cultures primaires présentent les critères ostéoblastiques, leur utilisation reste délicate en raison de l'absence de pureté de la population cellulaire, de leur faible capacité de prolifération et la nécessité de contrôler le phénotype en cours de culture. Ces cellules doivent être utilisés dans des passages précoces car une dédifférenciation des cellules ostéoblastiques après plusieurs passages (4 à 6) peut être observée.

II.3. Les conditions de culture cellulaire tridimensionnelle

Les systèmes de culture conventionnels en deux dimensions ne reflètent pas les conditions de l'*in vivo*. Ils imposent notamment une géométrie et des contraintes non naturelles, ce qui affecte certainement les cellules (Rossi, Barros et al. 2005). L'avantage de cultiver les cellules osseuses dans un environnement en trois dimensions est de recréer le plus possible les conditions physiologiques, et de se rapprocher de leur état *in vivo*. Cependant, la culture 3D *in vitro* présente certaines difficultés, il faut un ensemencement uniforme et à une densité cellulaire appropriée, de plus, les cellules doivent être en contact avec le milieu afin d'assurer une nutrition efficace.

L'ensemencement des biomatériaux 3D est une étape cruciale, la densité cellulaire initiale va déterminer la progression de la formation du tissu osseux *in vitro* (Holy, Shoichet et al. 2000). Par ailleurs, un paramètre essentiel, est de réussir à répartir de manière homogène les cellules à l'intérieur du biomatériau. Même avec un biomatériau assez fin (5mm diamètre x 2mm de hauteur), il est très difficile d'obtenir une densité uniforme à travers tout le volume. Les cellules ont tendance à s'attacher à la surface du biomatériau. Certains bioréacteurs peuvent être utilisés pour améliorer l'ensemencement. Généralement, ils maintiennent la pastille en place alors que la suspension de cellules est agitée autour par des mouvements de convection (Martin, Wendt et al. 2004) [Figure 18](#). Ces bioréacteurs peuvent servir à faciliter l'ensemencement mais leur rôle majeur est de permettre un apport efficace en oxygène et en éléments nutritifs pour développer des cultures cellulaires 3D sur le long terme. Le centre des biomatériaux de diamètre supérieur à 1 mm contient généralement des cellules en nécrose et en hypoxie sur des cultures à long terme. En revanche les cellules en périphérie sont tout à fait viables. Par exemple, la déposition de la matrice minéralisée par des ostéoblastes cultivés dans du PLGA ne se fait pas à plus de 240µm de profondeur (Ishaug, Crane et al. 1997). Les

bioréacteurs les plus basiques dispensent une agitation du milieu de culture autour de la pastille. Ce système facilite le mélange de l'oxygène et des nutriments, la diffusion du milieu est alors améliorée et plus homogène. Le débit de la perfusion des bioréacteurs peut aussi être adapté et utilisé pour appliquer des forces de cisaillement aux cultures 3D.

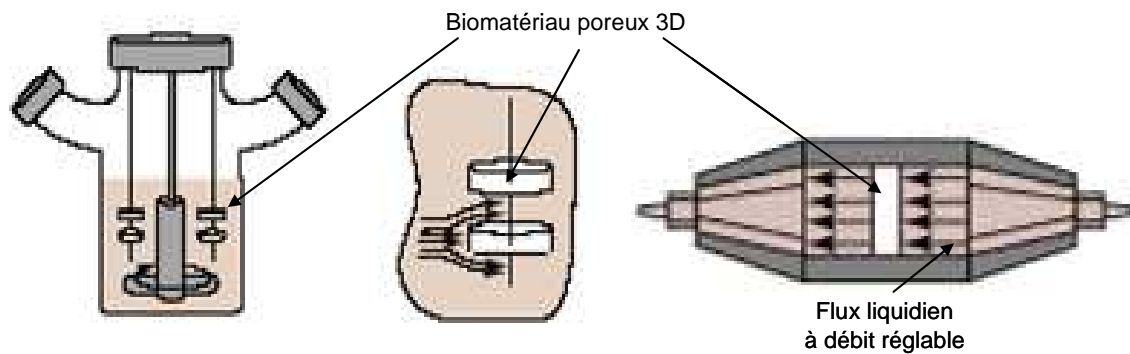


Figure 18 : Exemples de bioréacteurs pouvant être utilisés pour l'ensemencement et/ou pour appliquer des forces de cisaillement à des cultures cellulaires 3D d'après Martin 2004.

II.4. Propriétés électriques des cellules en culture

II.4.1. Le potentiel transmembranaire

La membrane plasmique cellulaire entoure le cytosol et les organites qui y baignent, définit la frontière de la cellule et la protège de l'environnement extracellulaire. Elle forme un film protecteur très fin (environ 5 à 10 nanomètres (nm) constitué de phospholipides arrangés en une double couche et des protéines. La membrane plasmique présente donc une structure moléculaire inhomogène qui lui permet de jouer un double rôle. Les phospholipides, qui constituent la matière de base de la membrane, en font un corps imperméable et isolant, protégeant ainsi la cellule des agressions extérieures, tandis que les protéines éparses permettent, dans certaines circonstances, des échanges entre le cytoplasme et le milieu environnant (matrice cellulaire, ou autre cellule). Le glycocalyx (couche superficielle entourant la face extra-cytosolique de la membrane plasmique) est composé par les chaînes de glycanes des lipides et des protéines membranaires mais aussi par de nombreux groupes d'acide sialique chargés négativement : la face externe de la membrane est donc chargée négativement (indépendamment du potentiel de membrane).

Au niveau d'une cellule individuelle, il existe un potentiel électrique (ou potentiel transmembranaire) de part et d'autre de la membrane plasmique lorsqu'elle est intacte [Figure 19](#).

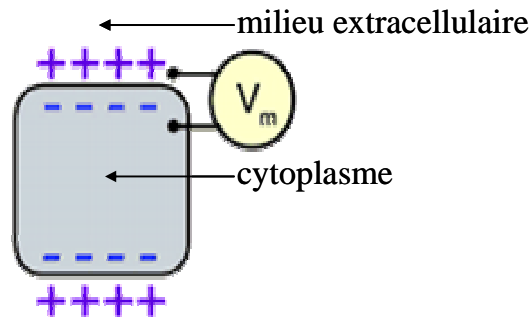


Figure 19 : Le potentiel de membrane (d'après (McCaig, Rajnicek et al. 2005))

Ce potentiel résulte du transport sélectif des ions à travers les canaux ioniques de la membrane ainsi que de la haute résistance électrique de la membrane plasmique (Endresen, Hall et al. 2000). La membrane plasmique peut être comparée à un isolant séparant deux milieux conducteurs, ce qui génère automatiquement un champ électrique avec des charges distribuées de part et d'autre de la membrane. De manière relative, l'intérieur de la cellule (cytoplasme) est chargé négativement par rapport à l'extérieur (milieu extracellulaire). Le potentiel de membrane est généralement de l'ordre de -20 à -200 mV, il varie selon le type cellulaire, pour les cellules osseuses, ce potentiel est de -70mV. L'épaisseur d'une membrane plasmique étant de 100\AA (10^{-8}m), le champ électrique moyen résultant de la différence de potentiel ($\approx 100\text{mV}$) de part et d'autre de la membrane plasmique est de l'ordre de 10^7 V/m (soit $E = U/D = 0.1/10^{-8}$, E : champ électrique en V/m, U : différence de potentiel en Volt, distance en mètre) (Panagopoulos, Messina et al. 2000). Une lésion dans la membrane plasmique va effondrer le potentiel électrique et créer un courant électrique local en laissant entrer les ions positifs dans le cytoplasme (McCaig, Rajnicek et al. 2005).

Un changement dans le profil électrostatique membranaire modifie les interactions protéiques environnantes, le potentiel de membrane est fortement relié aux mécanismes de transport cellulaire et aux voies de signalisation intracellulaire. Ainsi, la valeur du potentiel membranaire influence profondément le comportement cellulaire, ce qui souligne l'importance de la dimension électrique au niveau de la biologie cellulaire (Olivotto, Arcangeli et al. 1996).

II.4.2. Le cytoplasme et le milieu de culture : des milieux conducteurs

Le cytoplasme d'une cellule est un milieu très hétérogène qui contient entre autres de nombreux ions, protéines et acides nucléiques; il renferme également de multiples organites et diverses structures membranaires. Tous ces éléments sont susceptibles d'affecter les propriétés diélectriques de la cellule.

Fear et Stuchly (Fear and Stuchly 1998) ont extrapolé un modèle électrique simplifié de la cellule. Dans ce modèle, la cellule est considérée comme un matériau électriquement hétérogène composé d'un cytoplasme homogène dont la taille varie de 1 à quelques micromètres (μm) suivant les cellules, entouré d'une fine membrane elle aussi homogène dont la taille est de l'ordre de quelques nanomètres. Le cytoplasme est considéré comme une solution ionique hautement conductrice, il présente une conductivité de 1 siemens par mètre (S/m) alors que la conductivité (= aptitude d'un « matériau » à laisser les charges électriques se déplacer librement) de la membrane varie de 10^{-7}S/m à 10^{-5}S/m , suivant le type de cellule. Les permittivités relatives sont égales à 80 dans le cytoplasme et à 11.3 dans la membrane. La permittivité est la propriété physique qui décrit la réponse d'un milieu donné à un champ électrique. Au niveau microscopique, la permittivité d'un milieu est liée à la polarisabilité électrique des molécules ou atomes constituant le matériau. Ce modèle constitue une approche dans l'étude de la répartition des champs dans une cellule. Elle reste approximative, notamment parce que les échanges intercellulaires ou les échanges cellule-milieu extracellulaire ne sont pas pris en compte.

Un champ électrique ne peut pas être maintenu dans une solution hautement conductrice (théorie de Debye) comme peut l'être le cytoplasme ou milieu extracellulaire. Lorsqu'un champ électrique est appliqué directement dans un milieu conducteur, il va créer une polarisation en redistribuant les charges présentes dans la solution, ce phénomène tend à réduire l'amplitude du champ à l'intérieur du milieu. Les charges libres vont, selon leur polarité, se déplacer vers l'anode ou la cathode. Ceci crée un nuage électronégatif autour de l'électrode, ce qui a un effet "écran" et donc contribue à atténuer le champ électrique.

Ainsi, le champ électrique présent au niveau de la membrane plasmique se concentre seulement à son niveau, il est rapidement atténué dans le cytoplasme et le milieu extracellulaire. D'après la théorie de "la distance de Debye", dans la plupart des cellules, le champ électrique dû à la résistance membranaire devient quasi inexistant à partir d'une distance d'éloignement de 1nm par rapport à la membrane plasmique.

III. CULTURES OSTEOBLASTIQUES (3D, 2D) SOUS CONTRAINTES MECANIKES

In vivo, la complexité du système explique qu'il est difficile de déterminer de manière très précise quels sont les effets des contraintes mécaniques sur le tissu osseux. De nombreux modèles in vitro ont donc été développés afin d'identifier quels sont les mécanorécepteurs ainsi que les voies métaboliques mises en jeu lors de l'application des contraintes.

Plusieurs dispositifs ont été conçus pour mimer les contraintes mécaniques perçues *in vivo* par les cellules osseuses. Les modèles de contraintes de culture cellulaire sont les forces de cisaillement générées par un mouvement de fluide, l'étirement uniaxial et l'étirement biaxial. Les effets de tels systèmes sur la déformation cellulaire sont schématisés sur la Figure 20.

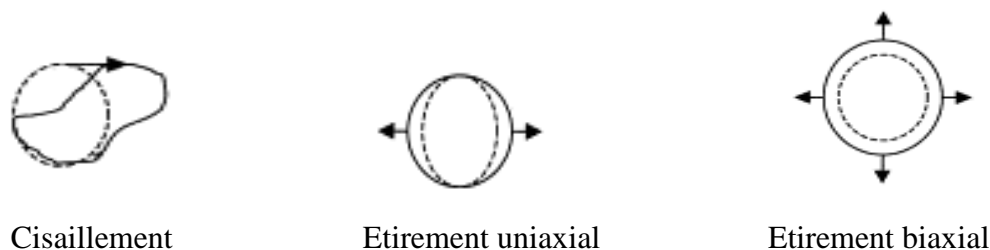


Figure 20 : Schéma de la déformation cellulaire en réponse au type de contrainte mécanique appliqué d'après Basso et al. (Basso and Heersche 2002)

Ces systèmes génèrent habituellement de fortes déformations ($>1000\mu\epsilon$) à faibles fréquences ($<3\text{Hz}$), depuis peu, la découverte des effets ostéogéniques des signaux basses amplitudes hautes fréquences a fait naître de nouveaux dispositifs.

III.1. Les contraintes appliquées à des cultures ostéoblastiques 3D : dispositifs et effets

III.1.1. L'ostéointégration des biomatériaux favorisée par stimulation mécanique

L'utilisation des matériaux artificiels est très fréquente en chirurgie traumatique ou orthopédique. Les mécanismes mis en jeu afin d'aboutir à la néoformation osseuse et à l'ostéointégration des prothèses ne sont encore que partiellement identifiés. C'est la raison pour laquelle de nombreux modèles « in vitro » de cultures ostéoblastiques sur biomatériaux ont été développés. Ce sont des matériaux biocompatibles, assimilables par les tissus vivants. Les biomatériaux peuvent être inertes sans réaction avec les tissus vivants (alumine ou titane...) ou actifs (corail, céramiques polycristalline en hydroxyapatite, phosphate tricalcique, vitrocéramiques, composites et polymères...). Ils sont plus ou moins résorbables et

disparaissent plus ou moins rapidement pour être remplacés par l'os nouveau. Ils ont l'avantage d'avoir des caractéristiques reproductibles et d'être disponibles en quantité non limitée.

Les biomatériaux doivent idéalement être ostéoconducteurs, c'est à dire aptes à recevoir la repousse osseuse, par invasion vasculaire et cellulaire à partir du tissu osseux receveur. De plus, le matériau implanté doit être ostéoinducteur, c'est-à-dire avoir la capacité d'induire une différenciation cellulaire pour synthétiser une matrice osseuse minéralisable.

Les biomatériaux sont poreux pour permettre la migration des cellules au centre du substitut, cependant, il est important qu'ils conservent une certaine résistance mécanique. Ainsi, ils permettent l'accrochage des cellules et apportent une certaine stabilité mécanique. *In vivo*, une interface est indispensable pour répondre aux changements physiologiques et biologiques, l'intégration avec le tissu environnant pourra alors se faire correctement (El-Ghannam 2005). La réussite de la greffe d'un biomatériau est fortement liée à la production quantitative et qualitative de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes, elle améliore l'attachement et l'adhésion des cellules hôtes à la surface du biomatériau et contrôle leur différenciation ostéogénique (Salasznyk, Williams et al. 2004; Datta, Holtorf et al. 2005). D'autre part, la matrice extracellulaire est un réservoir de facteurs de croissance (Amoroso, Del Porto et al. 1997) parmi lesquels les facteurs angiogéniques qui conditionnent la vascularisation de l'implant (Shen, Shoichet et al. 2008). Une contrainte mécanique adaptée est capable de stimuler les ostéoblastes de manière à accélérer le dépôt de matrice (Sikavitsas, 2003) et sa maturation (Sittichockechaiwut, 2009). Cependant les contraintes mécaniques et notamment la compression sont difficilement applicables à des biomatériaux rigides telles que les céramiques macroporeuses. Il serait alors nécessaire de diminuer fortement l'amplitude des compressions. Nous pensons que cette diminution d'amplitude pourrait être « compensée » par une fréquence élevée d'application du signal.

III.1.2. Les céramiques de phosphates de calcium

Les Hydroxyapatites (HA) synthétiques ou biologiques ont pour formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ principale composante minérale de l'os. Ces biomatériaux sont poreux pour permettre la colonisation des cellules au centre du substitut. Cette céramique facile à mettre en œuvre par frittage, a logiquement été au centre des recherches menées dans le champ des substituts osseux. Les hydroxyapatites d'origine bovine et d'origine corallienne subissent une pyrolyse puis une céramisation par chauffage à 1200-1300° afin d'obtenir un chargement en hydroxyapatite à 90 %. Ces implants n'exposent à aucun risque immunitaire et conservent en

partie de bonnes propriétés mécaniques. Les HA synthétiques sont les céramiques les plus proches des cristaux d'apatite biologiques. Le rapport atomique Ca/P (1,67) est proche de celui de l'os. Il s'agit d'une synthèse chimique stricte avec une caractérisation chimique fiable et l'absence totale de structures organiques. Dans ce cas, il est essentiel de connaître l'origine chimique, la structure cristalline et l'existence d'une microporosité (de 5 à 10 microns), qui correspond aux joints de grains de céramique. La macroporosité peut être obtenue par des pyrogènes et doit être supérieure à 100 microns pour permettre la cellularisation des matériaux.

III.1.3. La dimension des pores et la porosité : un compromis entre ostéogénèse et propriétés mécaniques

La porosité, exprimée en pourcentage, correspond au rapport du volume des espaces vides de matière sur le volume global du matériau. La porosité est dite continue si les pores sont interconnectés entre eux, et ouverte si les pores débouchent à l'extérieur. On parle de macroporosité lorsque les pores font plus de 100 μm de diamètre et de microporosité si le diamètre est inférieur à 5 μm . Les rapports respectifs de la microporosité et de la macroporosité ainsi que la taille des pores conditionnent les propriétés mécaniques et la repousse osseuse dans le matériau. Ces paramètres devront donc être précisés séparément pour caractériser une céramique (Karageorgiou and Kaplan 2005).

La régénération du tissu osseux dans un biomatériau *in vivo* implique le recrutement et la pénétration des cellules du tissu osseux environnant mais également la vascularisation. En ce qui concerne la taille des pores, Hulbert et al. (1970) (Hulbert, Young et al. 1970) ont montré qu'elle devait être au minimum de 100 μm pour permettre la formation du tissu osseux *in vivo*. D'autres études *in vivo* ont vérifié l'hypothèse selon laquelle l'ostéogénèse est améliorée par une taille des pores et une porosité plus importante. Roy (Roy, Simon et al. 2003) a utilisé un biomatériau (PLGA (polylactic-co-glycolic acid) avec 20% de β TCP, taille des pores de 125 à 150 μm , avec un gradient de porosité allant de 80 % à 88%; après implantation dans un crâne de lapin, la formation du tissu osseux a été prépondérante dans les zones où la porosité était la plus importante. Tsuruga (1997) (Tsuruga, Takita et al. 1997) étudie des céramiques d'HA avec des pores de différentes tailles (106-212, 212-300, 300-400, 400-500, 500-600 μm) implantés en sous cutanée chez des rats. L'activité PAL, la quantité d'ostéocalcine et la formation du tissu osseux sont plus importantes avec les pores de 300-400 μm . En outre, cette taille correspond à la taille critique qui permet d'observer des capillaires. La porosité (Okamoto, Dohi et al. 2006) influence également la différenciation ostéoblastique des cellules

souches mésenchymateuses. Après deux semaines de culture, l'activité PAL et la production d'ostéocalcine augmente avec l'augmentation de la porosité totale (30%, 50%, et 70%) des céramiques d'HA.

Ainsi, augmenter la porosité et la taille des pores facilite la vascularisation du matériau implanté ainsi que la formation osseuse, cependant ce n'est pas sans conséquences sur ses propriétés mécaniques. On peut cerner les limites d'un biomatériau trop poreux, en notant que les propriétés mécaniques s'effondrent lorsqu'on dépasse 60% de porosité (Okamoto, Dohi et al. 2006). Ceci pose de gros problèmes notamment *in vivo* juste après implantation, lorsque le biomatériau subit de fortes contraintes (Adachi, Osako et al. 2006). Le Huec (Le Huec, Schaevebeke et al. 1995) a testé 150 céramiques d'HA avec des porosités différentes, le volume poreux variant de 20% à 60% et la taille des pores de 5 μm à 400 μm . Les résultats indiquent que la porosité totale ainsi que la taille des pores influence la résistance à la force de compression, comme l'illustre la Figure 21.

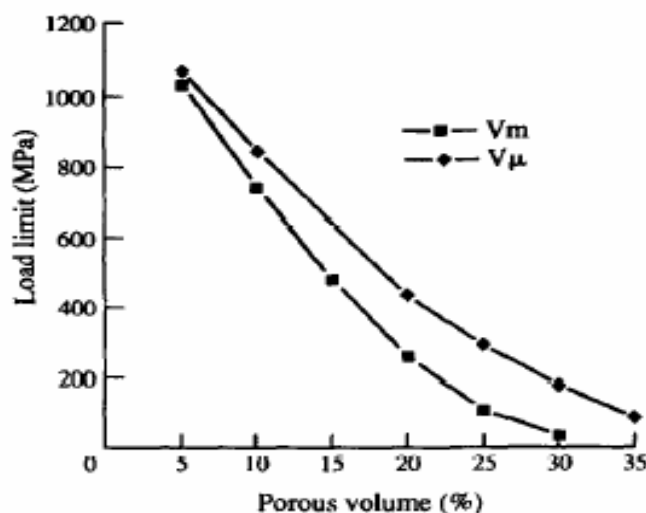


Figure 21 : Contrainte admissible en fonction du volume poreux du biomatériau (Le Huec et al. 1995)

Les propriétés mécaniques des céramiques sont donc faibles et fonction de la macroporosité. Pour une porosité de 60 % (proche de celle du spongieux), les valeurs sont de 1 à 3 MPa. Ainsi ces matériaux présentent le défaut de toute céramique: elles ont un comportement fragile, et de faibles contraintes à la rupture (Chevalier 2009), ce qui pose problème lorsque l'on veut stimuler le métabolisme des cellules osseuses par une contrainte mécanique, autrement dit mettre en charge le biomatériau. La contrainte admissible diminue avec l'augmentation du volume poreux du biomatériau, un compromis sur la géométrie et l'organisation du matériau doit être envisagé s'il est soumis à des contraintes mécaniques.

III.1.4. La compression

Dans ce paragraphe nous avons choisi de détailler uniquement la contrainte mécanique en compression car c'est celle qui a été utilisée dans cette thèse et d'autre part elle propose un modèle *in vitro* d'environnement mécanique physiologique similaire à celui qu'on pourrait trouver *in vivo* au niveau de l'os trabéculaire. Elle génère une déformation dynamique du biomatériau ainsi qu'un changement de volume au niveau du fluide présent dans les macropores ce qui provoque temporairement des gradients de pression. La compression semble être un type contrainte intéressant en ingénierie tissulaire car elle engendre au niveau des ostéoblastes les multiples contraintes que l'on retrouve *in vivo* : déformation cellulaire directe, forces de cisaillement, potentiels de flux et pression hydrostatique (Chunqiu, Xizheng et al. 2006).

➤Les dispositifs d'application d'une contrainte en compression

La conception des dispositifs de mise en compression a l'avantage d'induire une déformation répartie de manière homogène sur l'échantillon. Les dispositifs de mise en compression ont surtout été développés pour l'ingénierie tissulaire du cartilage (Demartean, Wendt et al. 2003; Raizman, De Croos et al. 2009). On peut décrire deux types de compression (Figure 22 d'après Brown 2000).

-Le principe de compression hydrostatique Figure 22a : l'échantillon est placé dans une chambre de culture en présence de milieu nutritif. La compression est alors générée en appliquant une charge mécanique sur la couche gazeuse présente à la surface du milieu de culture.

-Le principe de la compression mécanique Figure 22b : l'échantillon est inclus dans une matrice 3D placée dans une chambre (avec milieu nutritif). La charge mécanique est alors appliquée directement sur la matrice en comprimant celle-ci. Dans une chambre non confinée, lors d'une compression, des échanges avec le milieu de culture environnant peuvent se faire via l'interconnection des pores : renouvellement des nutriments et dispersion des déchets produits par la culture.

Ce type d'appareillage a été notamment utilisé sur les explants osseux (Rawlinson, Mosley et al. 1995; David, Guignandon et al. 2008) et depuis peu sur des biomatériaux cellularisés ((Demartean, Wendt et al. 2003; Raizman, De Croos et al. 2009; Sittichokechaiwut, Scutt et al. 2009).

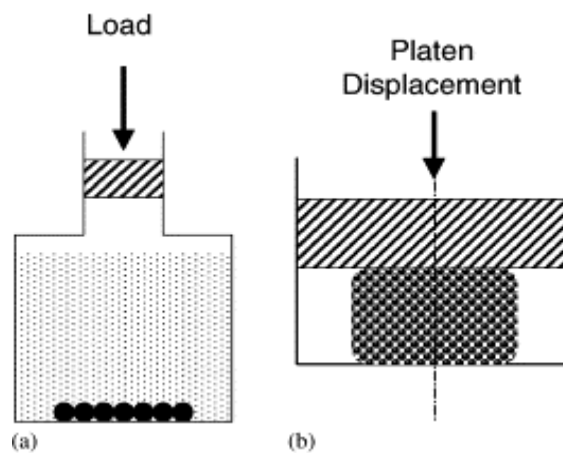


Figure 22 : Les dispositifs de mise en déformation par compression d'après Brown, 2000. (a) Principe de la compression hydrostatique (b) Principe de la compression mécanique

➤L'exemple du Zetos : un dispositif de compression mécanique

Le « système de diffusion et contrainte mécanique » ZETOS est le résultat de six années de recherche du « Laboratoire d'Orthopédie et Biomécanique Expérimentale » de l'Université Philipps de Marburg (Allemagne) sous la direction du Pr. David JONES. Il a été conçu pour la mise sous contrainte d'échantillons osseux. Cet appareil a la potentialité d'appliquer une compression précise sur les échantillons avec des fréquences et des amplitudes pouvant être définies ou « designées » par l'utilisateur. Ces qualités lui permettent donc d'être également un outil de compression pour les biomatériaux.

Le dispositif de contrainte est entièrement piloté par ordinateur grâce à un module électronique. Il possède un piezo déclencheur (situé dans le piston de charge) qui transforme une tension électrique en expansion, la charge électrique est directement proportionnelle à l'amplitude de la charge mécanique subie. Dans le piston de charge, on trouve un capteur (détecteur de force) agissant en feedback pour contrôler la charge appliquée à chaque chambre et donc la déformation que le biomatériau reçoit.

Un amplificateur pilote le piezo déclencheur. L'amplificateur à haute tension présente des limites à des fréquences supérieures à 50 Hz qui se manifestent par une baisse d'amplitude et un déphasage dus à une puissance limitée, à la capacité du piezo déclencheur et à l'atténuation du signal par l'échantillon. Tous ces effets conduisent à une déformation du signal de sortie, si la distribution spectrale du signal d'entrée contient des composants à haute fréquence. Les limites d'amplitude et de fréquence dépendent notamment de la rigidité et la masse de l'échantillon.

Le dispositif qui permet d'exercer un régime de contrainte mécanique est représenté dans la [Figure 23](#).

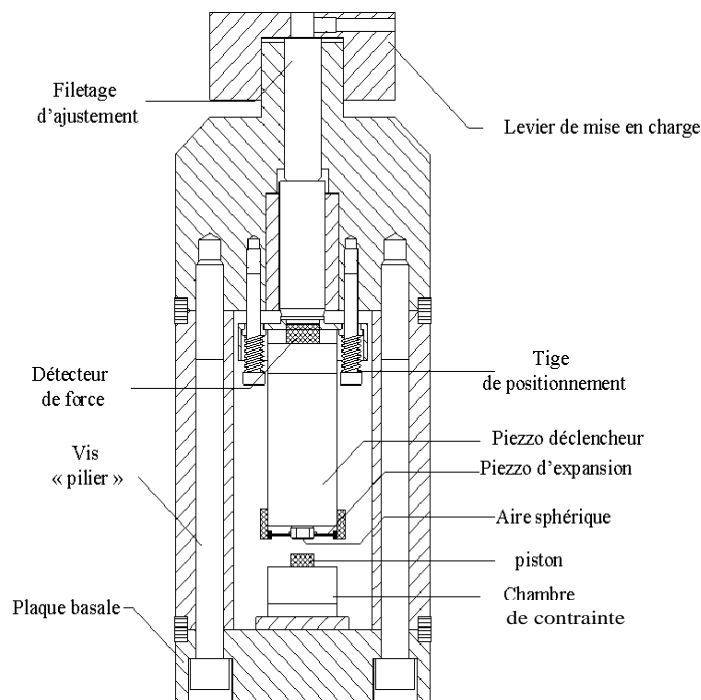


Figure 23 : Détails du dispositif de contrainte du ZetOs. Grâce à un mécanisme de senseurs et d'effecteurs piézo-électriques, une contrainte en déplacement est appliquée par l'aire sphérique sur le piston de la chambre de culture, renfermant un biomatériau. (cf. texte pour les explications).

Les composants du dispositif de contrainte sont :

- **le piezo détecteur de force (KISTLER)**. Cette sonde a une rigidité élevée (1,8 kN/ μ m). Elle engendre un courant électrique, proportionnel à la force subie.
- **le piezo déclencheur (Physik Instrumente, PI)**. Il transforme une tension électrique en expansion. La réponse électrique du déclencheur est comme celle d'un condensateur. Le déclencheur n'est pas parfaitement linéaire.
- **le piezo d'expansion**. Il s'agit d'un pont de Wheatstone (jauge de contrainte), relié au piezo déclencheur.
- **le levier de mise en charge** pour fixer la chambre de culture, destinée à la contrainte, et pour la précontrainte manuelle.

Afin de s'assurer de la stabilité et de la linéarité des mesures, en évitant les distorsions dans la surface de contact système-chambre, la jauge de contrainte est reliée à une lentille plane convexe en saphir, à surface polie cette surface sphérique qui assurera le contact avec le

piston de la chambre de contrainte, et c'est cette surface qui se déforme au contact du piston, au fur et à mesure que l'expansion augmente.

La chambre de contrainte du système ZetOs [Figure 24](#) est aussi utilisée comme bioréacteur pour les cultures d'explants osseux (David et al. 2008) grâce à un système de perfusion ; elle devrait évoluer afin de permettre la culture long terme de biomatériaux cellularisés.

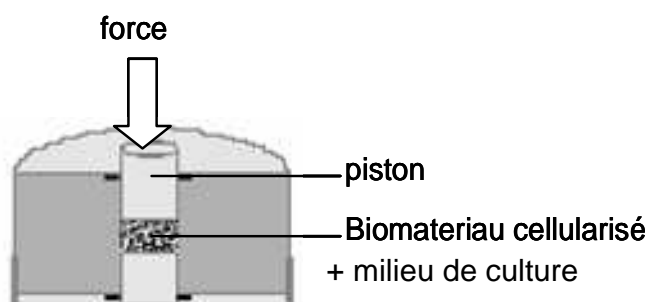


Figure 24 : Schéma de la chambre de contrainte du système ZetOs

➤ Réponse des ostéoblastes aux contraintes mécaniques en compression

Les contraintes mécaniques en compression utilisées pour déformer les supports de culture « élastiques » sont souvent supra physiologiques.

L'utilisation du poly(e-caprolactone) (PCL) comme microenvironnement 3D permet d'appliquer des contraintes dynamiques (0,5Hz) en compression de fortes amplitudes : 10 ou 20 % ce qui correspond à des déformations de 100 000 à 200 000 μe et à des pressions de 11 à 30 kPa (Rath, Nam et al. 2008). Une amplitude de 10% est un signal ostéogénique alors que les cellules ne répondent pas à une compression de 20%. En effet le signal de 10% induit l'augmentation de l'expression des gènes et des protéines des marqueurs de la différenciation ostéoblastique (runx2 et la PAL) ainsi que celle des protéines de la matrice extracellulaire (collagène de type I, l'ostéopontine, l'ostéocalcine et l'ostéonectine). Même dans ces gammes de très fortes amplitudes, la réponse des ostéoblastes dépend de l'amplitude utilisée. Cependant, on peut supposer que des compressions aussi élevées que 20% causent des effets délétères au niveau cellulaire, ce qui expliquerait l'absence de réponse ostéoblastique lorsque les amplitudes deviennent trop élevées. Une étude avec une amplitude mécanique similaire (10%, 0,05Hz) montre que la différenciation ostéoblastique des cellules souches est augmentée (Runx2 et ostéocalcine) sous cette compression (Jagodzinski, Breitbart et al. 2008). Alors que cette étude rapporte des effets de la compression sur les phases précoces de la différenciation, d'autres études s'intéressent la minéralisation de la matrice. Sittichokechaiwut et coll.

(Sittichockechaiwut, Scutt et al. 2009) ont utilisé un support de culture 3D en polyurethane ensemencé avec des cellules ostéoblastiques très différenciées (MLO-A5) considérées comme des préostéocytes capables de synthétiser rapidement une matrice extracellulaire minéralisée. Des contraintes dynamiques (1Hz) en compression (5%) sont appliquées. Après un épisode de contrainte au jour 5, le collagène de type I, l'ostéopontine et l'ostéocalcine sont déjà augmentées. Après 20 jours de culture, le contenu en collagène a doublé et celui en calcium a quadruplé dans les échantillons qui ont reçus 3 épisodes de contrainte mécanique. Ainsi, le contenu de la matrice extracellulaire et son processus de minéralisation sont donc fortement influencés par la compression dynamique. Cette étude montre que la viabilité cellulaire est améliorée à 10 jours par la contrainte mécanique, on peut cependant se demander si ce résultat est effectivement dû à la compression ou si c'est un effet indirect de celle-ci. En effet sous une forte compression comme celle appliquée dans cette étude (5%), on peut imaginer que le milieu de culture va être mis en mouvement, ce qui induit la redistribution des éléments nutritifs, de l'oxygène et donc améliorerait la viabilité cellulaire.

III.1.5. La déformation des cultures osteoblastiques 3D par alternance de traction et compression

Ce type de déformation ne peut s'appliquer qu'à des matrices 3D non rigides. Pour cela, le collagène est un matériel de choix. Des ostéoblastes (MC3T3-E1) sont cultivés dans des gels de collagène 3D et déformés grâce au dispositif décrit [Figure 25](#) (Tanaka, Li et al. 2003). La matrice collagénique est successivement comprimée et étirée grâce à un actionneur piézoélectrique qui se déforme lorsqu'on lui applique une tension sinusoïdale.

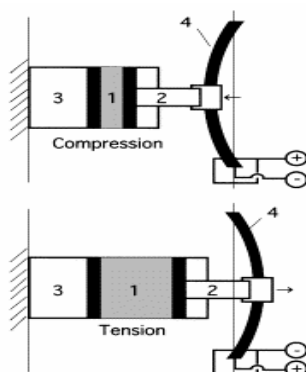


Figure 25 : Schéma d'un stimulateur mécanique appliquant successivement une traction et une compression à des cultures 3D dans des matrices collagéniques (Tanaka, Li et al. 2003). (1) Gel de collagène cellularisé, (2) ventouse mobile, (3) ventouse fixe, (4) actionneur piézoélectrique.

Tanaka a testé 3 types de signaux, chacun appliqué 3 minutes par jour sur une durée de 3 ou 7 jours. Le signal sinusoïdal de 3 Hz induit une compression de 0 à -3000 $\mu\epsilon$ qu'il qualifie de haute amplitude basse fréquence mais on peut cependant noter qu'il reste dans une gamme d'ordre physiologique. Le deuxième signal délivre une succession d'étirement et de compression de basse amplitude (300 $\mu\epsilon$), large fréquence (0 à 50Hz, « bruit ») type BAHF. Le troisième signal résulte de la superposition des deux stimuli précédents. Pour les 3 types de signaux, la PAL, le collagène de type I et l'ostéopontine restent inchangés. Après 8 jours de stimulation avec les signaux superposés, on observe une augmentation de l'ostéocalcine. Ces résultats suggèrent que la résonance stochastique (amplification d'un signal par l'ajout de vibration ou « bruit ») pourrait contribuer à la réponse ostéogénique.

Une autre équipe (Ignatius, Blessing et al. 2004; Ignatius, Blessing et al. 2005) a appliqué un étirement cyclique uniaxial sur des matrices collagéniques 3D (30×30×4 mm³). Pour se faire, ils ont adapté un dispositif de contrainte déjà connu pour effectuer un étirement mécanique sur des cultures cellulaires 2D (Neidlinger-Wilke, Wilke et al. 1994). Un gel de collagène cellularisé est coulé sur des membranes de silicone qui reçoivent l'étirement. Les cultures ont été soumises à une contrainte cyclique (1Hz) supraphysiologique (10 000 $\mu\epsilon$) durant 30 minutes par jour, sur une période de 3 semaines. L'expression des gènes relatifs à la différenciation ostéoblastique montre une augmentation de Runx2 et du collagène de type I en début de culture (3 à 7 jours) alors que la PAL n'est augmentée qu'après 7 jours de contrainte. L'ostéopontine et l'ostéocalcine voient leur expression augmentée de manière biphasique, la stimulation mécanique affectant leur expression en début (3 jours) et en fin (14-21 jours) de culture. Comme les signaux physiologiques, cette compression supraphysiologique influence la différenciation ostéoblastique, cependant cette dernière agit également sur la prolifération cellulaire ce qui n'était pas le cas dans l'étude menée par Tanaka.

III.2. Cultures ostéoblastiques 2D et contraintes mécaniques

III.2.1. Les principaux dispositifs de traction et compression pour cultures 2D

➤L'étirement uniaxial

L'étirement uniaxial d'un os *in vivo* produit une traction parallèle au sens de l'étirement et une compression du tissu osseux perpendiculairement au sens d'étirement [Figure 26](#) (Basso

and Heersche 2002). De la même manière, dans les systèmes de mise en déformation par étirement longitudinal du substrat, la traction cellulaire se produit dans une seule direction et elle est accompagnée par une compression de la membrane dans le plan perpendiculaire à l'étirement.

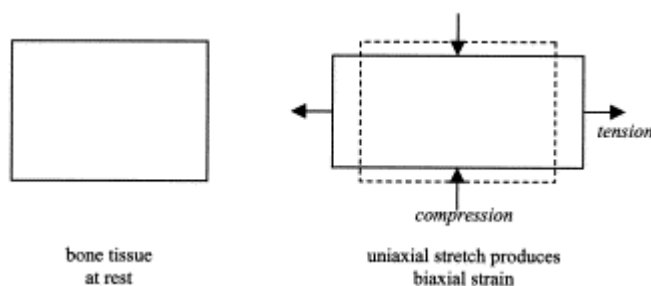


Figure 26 : L'étirement uniaxial du tissu osseux produit une contrainte biaxiale : une traction parallèle à l'étirement et une compression dans le plan perpendiculaire (d'après Basso 2002)

Les appareils comprennent une membrane élastique (généralement de silicone) utilisée comme support de culture qui est soumise à un étirement uni axial généré mécaniquement [Figure 27](#). Les cellules sont cultivées sur une membrane élastique elle-même placée dans une chambre de culture en présence de milieu nutritif. Des forces mécaniques vont alors être appliquées à l'extrémité de la membrane. Ces dispositifs sont simples de conception et présentent l'avantage de pouvoir contrôler facilement les paramètres de la déformation tels que l'amplitude et la fréquence des contraintes. La distribution des contraintes dépend de la géométrie de l'échantillon et du support étudié (membranes élastiques). Les appareils de mise en déformation longitudinale ont été utilisés pour déterminer les effets des contraintes mécaniques sur le comportement de cellules d'origines diverses (calvaria de rat, poumons de rat) (Xu, Liu et al. 1996; Smalt, Mitchell et al. 1997; You, Yellowley et al. 2000).

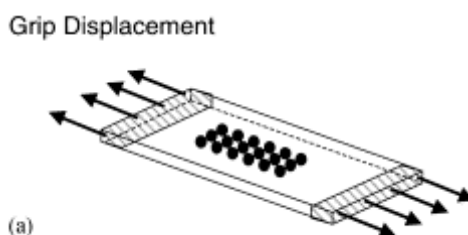


Figure 27 : Dispositif de mise en déformation par étirement longitudinal du substrat d'après Brown, 2000.

➤L'étirement par flexion du substrat

Ils sont également composés d'une membrane élastique (silicone, polycarbonate) utilisée comme support de culture. Les contraintes mécaniques sont alors générées selon la technique de « flexion 4 points » décrite par Zaman et Coll, 1997 (Zaman, Suswillo et al. 1997) [Figure 28](#). Les cellules sont cultivées sur une membrane élastique elle-même placée dans une

chambre de culture en présence de milieu nutritif. La flexion du substrat est alors induite grâce à l'utilisation simultanée de 2 plots permettant de bloquer la membrane et de 2 charges mécaniques appliquées au niveau des extrémités, on parle de flexion 4 points. Ce procédé de déformation est simple de mise en oeuvre et permet de générer contrairement aux dispositifs décrits précédemment des contraintes mécaniques de faibles amplitudes d'ordre physiologique ($< 3\,000\ \mu\epsilon$). Cette technique de mise en déformation par flexion du support, lorsqu'elle est utilisée en condition dynamique, va générer à la fois des contraintes en traction et des contraintes en compression sur la culture ostéoblastique. Les inconvénients liés à l'utilisation de cette technique sont aussi une répartition hétérogène des contraintes mécaniques au niveau de l'échantillon (tapis cellulaire).

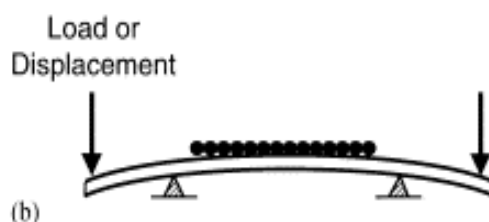


Figure 28 : Dispositif de mise en déformation par flexion du substrat d'après Brown, 2000

➤L'étirement biaxial

Dans les systèmes de culture *in vitro*, le terme d'étirement biaxial est utilisé pour décrire l'étirement d'une membrane (généralement circulaire) dans toutes les directions simultanément. La technique de mise en déformation par distension du substrat est l'une des plus utilisées actuellement pour étudier le comportement cellulaire en condition dynamique.

Les premiers dispositifs créaient une déformation par distension associée à un déplacement du plan du support. Ces modèles avaient donc comme principal inconvénient d'induire des contraintes mécaniques dont l'amplitude variait en fonction de la région du support. Ces modèles ont évolué pour pallier les problèmes d'hétérogénéité de déformation. Ainsi, Schaffer et Coll, 1994 (Schaffer, Rizen et al. 1994) mais aussi Hung et Williams, 1995 (Hung, Pollack et al. 1995) sont les premiers à avoir envisagé la mise en déformation par distension du support sans déplacement de plan [Figure 29](#). La distension de la membrane peut être induite par déplacement d'anneaux métalliques sous le support élastique [Figure 29a](#), par génération du vide sous le substrat et utilisation de plots bloquant la partie centrale de la membrane (nouvelle version du dispositif Flexercell® (Flexcell 1997) [Figure 29b](#) ou par

étirement bi axial du support [Figure 29c](#) (Norton, Andersen et al. 1995). (----) Indique la position initiale de la membrane, (—) indique la position de la membrane après distension.

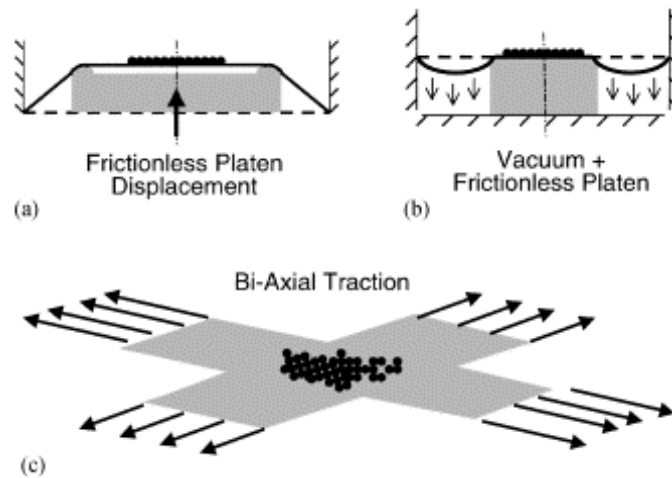


Figure 29 : Dispositifs de mise en déformation par distension du substrat sans déplacement du plan du support d'après Brown, 2000.

Tous les dispositifs ci-dessus engendrent des contraintes mécaniques de hautes amplitudes ($>300\mu\epsilon$) basses fréquences ($<5\text{Hz}$), ils n'ont pas la précision nécessaire pour appliquer des contraintes de plus faibles amplitudes.

III.2.2. Dispositif générant des contraintes mécaniques BAHF

Les récentes études *in vivo* montrent que les signaux BAHF peuvent également être ostéogéniques (Prisby, Lafage-Proust et al. 2008; Judex, Gupta et al. 2009). Il apparaît donc nécessaire de développer des appareils capables de générer ces signaux types vibrations sur des cultures ostéoblastiques. Rosenberg et al. (Rosenberg, Levy et al. 2002) sont les premiers à proposer un modèle expérimental de stimulation [Figure 30](#). Une plaque de culture est disposée sur un pot vibrant de façon à se déplacer horizontalement. Le pot vibrant est contrôlé par un amplificateur et un générateur de tension sinusoïdale. Les fréquences générées vont de 20 à 60Hz et le déplacement est de $25\mu\text{m}$ quelle que soit la fréquence (mesurée par un capteur de déplacement). L'accélération est mesurée par un accéléromètre, avec l'augmentation en fréquence elle passe de $0,5\pm 0,1$ à $1,3\pm 0,1$ m/sec^2 soit $\approx 0,05$ à $0,13$ g ($1\text{g} = 9,81\text{m/sec}^2$).

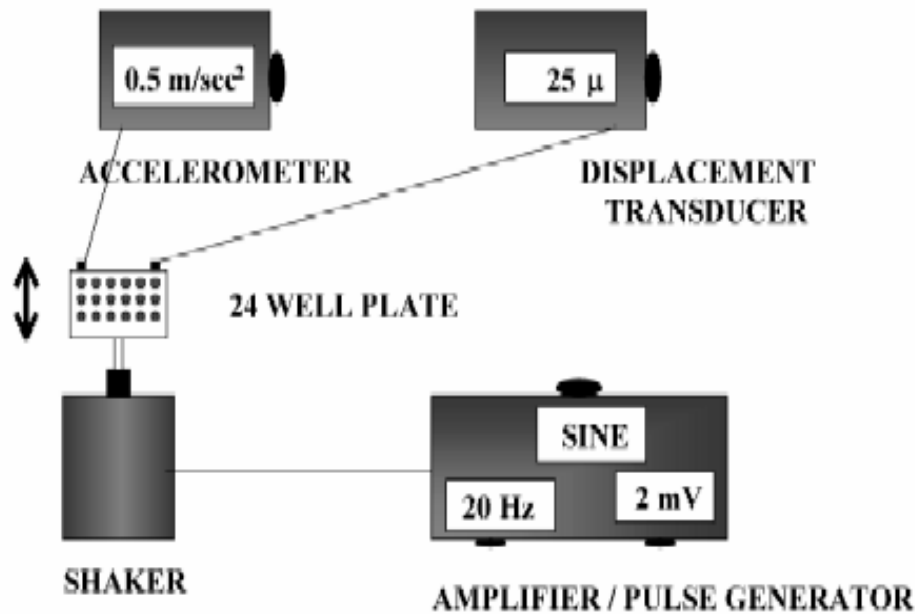


Figure 30 : Dispositifs de mise en vibration d'une culture ostéoblastique (déplacement dans le plan horizontal) Rosenberg 2002.

Depuis une autre équipe a utilisé un dispositif similaire (Bacabac, Smit et al. 2006), les fréquences utilisées vont de 5 à 100Hz et les déplacements sont plus importants que dans l'étude précédente, ils vont de 5000 à 75 µm respectivement. Les accélérations que Bacabac utilise sont bien plus importantes que l'équipe précédente mais pour lui les cellules répondraient en fonction non pas de l'accélération mais de la dérivée de l'accélération, appelée le jerk et s'exprimant en m/sec³.

Il semble que ce soit les seules études *in vitro* appliquant des vibrations sur les cultures ostéoblastiques 2D. Les vibrations induisent des déformations extrêmement faibles de moins de 5 µε (Judex, Gupta et al. 2009) et les autres dispositifs décrits précédemment ne permettent que des amplitudes supérieures à 300µε. Ainsi, il manque des dispositifs capables de produire des déformations intermédiaires (entre 10 et 300µε). D'autre part, on peut noter que les effets de stimulations à des fréquences encore plus élevées (>100Hz) n'ont pas été étudiés.

Ce paragraphe n'est pas exhaustif nous n'avons décrit que quelques dispositifs de contraintes mécaniques utilisées sur des cultures 2D. Nous n'avons décrit que les principaux modèles capables de fournir des contraintes en compression/traction ou bien de générer de très faibles amplitudes de déformation à haute fréquence (vibrations).

III.2.3. Les effets des contraintes mécaniques sur les cultures ostéoblastiques 2D

La réponse des ostéoblastes à l'augmentation de contrainte mécanique va dépendre de nombreux paramètres (Torcasio, van Lenthe et al. 2008) tels que le type de contrainte (McGarry, Klein-Nulend et al. 2005), son amplitude (Zhu, Zhang et al. 2009), sa fréquence (Faure, Linossier et al. 2008) ou encore le temps de récupération entre chaque épisode de stimulation (Robling, Burr et al. 2000).

►La prolifération et la différenciation

Dans la plupart des expérimentations utilisant des contraintes supra-physiologiques, la prolifération des cellules ostéoblastiques primaires est stimulée et ce quels que soient l'espèce et le type de déformation (biaxiale, multiaxiale) (Kaspar, Seidl et al. 2000; Kaspar, Seidl et al. 2002; Weyts, Bosmans et al. 2003). Encore récemment, Bhatt (Bhatt, Chang et al. 2007) montre une augmentation de la prolifération (3 fois) des ostéoblastes primaires humains sous une contrainte cyclique uniaxiale supra-physiologique allant de 30 000 à 90 000 $\mu\epsilon$. En revanche, les contraintes mécaniques d'amplitude plus faible (4000 $\mu\epsilon$, 1Hz) semblent ne pas avoir d'effet sur la prolifération des ostéoblastes humains (Fermor, Gundle et al. 1998). L'amplitude des stimulations serait donc un des paramètres qui influence la prolifération des ostéoblastes primaires. On retrouve d'ailleurs cet effet amplitude dans les études qui ont travaillé avec des lignées. On note un effet positif des déformations mécaniques d'amplitudes encore assez élevées (1700 à 3500 $\mu\epsilon$, 1Hz) sur la prolifération de cellules immortalisées (MC3T3-E1) (Zhuang, Wang et al. 1996) ou ostéosarcomateuses (ROS 17/2.8) (Cheng, Zaman et al. 1999). Des contraintes mécaniques d'amplitude plus faible (600 $\mu\epsilon$, 0,25Hz) n'ont pas d'effet sur la prolifération des cellules MG-63 (Di Palma, Douet et al. 2003). On sait cependant que la prolifération est un paramètre déréglé dans toutes les cellules transformées et que la croissance et la différenciation cellulaires, qui sont deux paramètres inversement couplés dans les cellules normales, ne le sont pas pour ce type de lignée.

Les résultats concernant la différenciation ostéoblastique sous contrainte mécanique sont extrêmement variés, une synthèse reste délicate en raison de la multiplicité des modèles (lignées cellulaires, amplitude, fréquence, durée, séquence). Par exemple, une déformation mécanique donnée (flexion 4 points, 1800 $\mu\epsilon$, 1Hz) stimule l'activité PAL dans des cultures primaires d'ostéoblastes issues de tibia de rat (Dodds, Ali et al. 1993) alors qu'une diminution de l'activité PAL est observée après application d'un autre type de déformation mécanique

(multiaxiale, 400 $\mu\epsilon$, 1Hz) sur des ostéoblastes provenant de calvaria de rat (Brighton, Strafford et al. 1991). La comparaison des résultats d'études menées sur des ostéoblastes d'origine humaine, semble montrer que l'amplitude des contraintes influence la différenciation ostéoblastique. En effet, les ostéoblastes augmentent leurs expressions d'ostéonectine, ostéopontine et ostéocalcine avec des niveaux de déformation très élevés : 30 000 $\mu\epsilon$ (Bhatt, Chang et al. 2007). En revanche, d'autres (Kaspar, Seidl et al. 2000) avaient précédemment démontré que des contraintes d'ordre physiologique (1000 $\mu\epsilon$, 1Hz) entraînaient une diminution de l'activité PAL et de l'expression de l'ostéocalcine. Neidlinger et Coll, 1994 et 1995 (Neidlinger-Wilke, Wilke et al. 1994; Neidlinger-Wilke, Stalla et al. 1995) n'observaient quand à eux aucun effet des contraintes mécaniques de 10 000 $\mu\epsilon$ sur l'activité de la PAL chez les cultures ostéoblastiques humaines. Les discordances de résultats entre ces études ne sont certainement pas dues seulement aux diverses amplitudes (qui peuvent varier du physiologique (400 $\mu\epsilon$) au supra physiologique (90 000 $\mu\epsilon$)) mais peuvent également être expliquées soit par l'utilisation de diverses techniques de mise en déformation soit par les types cellulaires utilisés ou encore par les séquences de contraintes. Des contraintes mécaniques d'ordre physiologiques appliquées pendant 24 heures en continu n'ont pas d'effet sur la différenciation cellulaire contrairement aux contraintes intermittentes de 15 minutes, répétées 3 fois par jour pendant plusieurs jours, qui stimulent l'activité PAL (Di Palma, Douet et al. 2003).

Plus récemment il est montré que la contrainte mécanique peut induire la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses. Ainsi, une contrainte de 2000 $\mu\epsilon$ appliquée pendant 40 minutes va stimuler la prolifération des cellules souches mésenchymateuses mais également l'activité de la PAL et l'expression de facteurs de croissance impliqués dans la différenciation des CSMs, Runx2 et Ets (erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1). Une augmentation significative de l'expression de Ets-1 est détectée immédiatement après l'épisode de stimulation mécanique, en revanche les expressions de Runx2 et de la PAL n'augmentent que plus tard (Qi, Hu et al. 2008). Une contrainte cyclique appliquée à des cellules stromales primaires augmente Runx2 (marqueur ostéoblastique) au dépend de PPAR γ 2 (marqueur adipocytaire) (David, Martin et al. 2007). D'autre part, en manipulant la tension cellulaire (effet indirect des contraintes mécaniques), il est possible de modifier l'engagement des CSMs vers les voies de différenciation adipocytaire ou ostéogénique (McBeath, Pirone et al. 2004).

Ainsi, les contraintes peuvent avoir des effets non seulement sur l'avancement de la différenciation ostéoblastiques mais également plus en amont, c'est à dire directement au niveau de l'engagement dans l'une des voies de différenciation.

►La production d'oxyde nitrique

Les ostéoblastes répondent à l'augmentation contraintes mécaniques (seulement à certains régimes, dit ostéogènes) par une production accrue de signaux moléculaires comme la production de NO (oxyde nitrique). Le NO est un radical libre de très brève durée de vie (quelques secondes). In vivo, c'est un modulateur de la pression vasculaire qui joue un rôle important dans la communication intercellulaire au niveau du système nerveux. Le NO est généralement considéré comme signal paracrine étant donné ses capacités de diffusion. Il est généré à partir de la L-Arginine par une NO synthase dont il existe trois isoformes ecNOS nNOS et iNOS ; toutes présentes dans le tissu osseux du rat (Helfrich, Evans et al. 1997). Fox et Chow ont montré que ecNOS est l'isoforme prédominante dans l'os humain et est fortement exprimée dans les ostéocytes et les cellules bordantes (Fox and Chow 1998). *In vivo* la présence d'un inhibiteur de la NOS réduit fortement le taux de formation osseuse induit par un chargement mécanique (Fox, Chambers et al. 1996; Turner, Takano et al. 1996). Les cellules osseuses humaines (Klein-Nulend, Helfrich et al. 1998), aviaires (Klein-Nulend, Semeins et al. 1995) et de rongeurs (Pitsillides, Rawlinson et al. 1995) produisent du NO de façon rapide et transitoire en réponse à un chargement mécanique *in vitro*. Par exemple l'application de contraintes de cisaillement à des cultures de cellules osseuses entraîne une augmentation rapide de la synthèse de NO maximale après 5 minutes (Bacabac, Smit et al. 2004). La rapidité de la réponse implique la présence constitutive de l'enzyme probablement l'isoforme ecNOS (Klein-Nulend, Helfrich et al. 1998). L'étude de Bacabac (Bacabac, Smit et al. 2006) sur les effets des signaux vibratoires montre également une augmentation de la sécrétion de NO par les ostéoblastes immédiatement après les 5 minutes de stimulation. Cette sensibilité est fréquence dépendante : plus la fréquence des vibrations augmente (5Hz à 100Hz) plus les cellules sécrètent de l'oxyde nitrique. La sécrétion de NO est maximale pour la fréquence la plus haute (100Hz).

Ainsi, le NO peut être considéré comme une molécule de signalisation de la contrainte mécanique, dans les études analysant l'effet d'un stimulus, il permet de repérer la sensibilité de la cellule aux différentes modalités de stimulations (McGarry, Klein-Nulend et al. 2005).

➤L'axe cytosquelette-intégrines

Bien que le mécanisme de détection initiale et de conversion des forces mécaniques en un signal biochimique ne soit que partiellement compris plusieurs mécanotransducteurs ont été proposés (Liedert, Kaspar et al. 2006) parmi lesquels on trouve :

- Les intégrines et plus particulièrement les récepteurs $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ ainsi que la sous-unité β_1 qui en présence de contraintes sont capables d'induire une réorganisation de la jonction intégrine-plaque d'adhésion-cytosquelette mais aussi d'activer la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) qui contrôle les événements beaucoup plus tardifs tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose ostéoblastiques.

- Les canaux ioniques à Na^+ et Ca^{2+} qui après stimulation mécanique induisent une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire dont la conséquence est d'activer la voie des PLC (phospholipase C) et de la PKC (Protein Kinase C) (également activable par la voie des MAPK). Ces voies peuvent elles aussi entraîner des modifications du phénotype ostéoblastique.

- Les gap junctions qui sous l'effet des contraintes vont permettre la propagation du signal calcique entre les différentes cellules afin d'amplifier la réponse ostéoblastique aux stimuli mécaniques.

Nous intéresserons principalement à l'axe intégrines-cytosquelette.

Le rôle de cet axe cytosquelette-intégrines dans le cadre de la réponse de la cellule à des déformations mécaniques de son environnement a été particulièrement étudié par Ingber (Ingber, Dike et al. 1994; Ingber 2003; Ingber 2003; Ingber 2008) et ses collègues en référence au comportement de la cellule endothéliale. Ils ont proposé à ce sujet un modèle théorique dans lequel la cellule est représentée comme une structure de tensegrité. La spécificité du modèle tient compte du fait que la cellule est attachée à certains composants de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires, les intégrines. Les composants extracellulaires tels que collagène de type I fibronectine ou ostéopontine possèdent en commun un groupe de trois acides aminés RGD servant de substrat d'adhésion à la partie extracellulaire de l'intégrine. La partie cytoplasmique de ces intégrines est liée à l'actine du cytosquelette (le cytosquelette comprend aussi des microtubules et filaments intermédiaires) par l'intermédiaire de protéines telles que la vinculine la thaline et l'alpha-actinine. Ainsi, lorsqu'on applique une contrainte mécanique à la surface des intégrines à l'aide de microbilles magnétisées recouvertes de séquences RGD on observe une augmentation de la rigidité

proportionnelle à la force appliquée augmentation analogue à celle observée dans le cas d'une structure de tenségrité.

Il n'est pas certain que pour d'autres types de sollicitations il en soit de même (Wang, Butler et al. 1993). Ce résultat est spécifique des intégrines dans la mesure où les liaisons établies au niveau des intégrines sont beaucoup plus rigides que celles formées avec d'autres récepteurs transmembranaires non liés au cytosquelette (Maniotis, Chen et al. 1997). Cette réponse mécanique du cytosquelette nécessite une interaction complexe des microtubules travaillant en compression des microfilaments et filaments intermédiaires intacts sollicités en traction. A l'intérieur de la cellule les microfilaments contractiles exerceraient une traction sur la membrane cellulaire et ses constituants en direction du noyau. Ces forces centripètes seraient équilibrées par deux éléments compressifs : 1) la matrice extracellulaire au niveau des points focaux d'adhésion 2) les microtubules ou des paquets de microfilaments d'actine réticulée. Les filaments intermédiaires connecteraient les microtubules et les microfilaments contractiles entre eux ainsi qu'à la membrane et au noyau.

Lors de l'attachement de la cellule aux composants extracellulaires on observe la formation de points focaux d'adhésion sites privilégiés de passage des contraintes mécaniques. La formation des points focaux d'adhésion est un processus dynamique répondant aux contraintes mécaniques. En effet la déformation d'un support entraîne une déformation de la cellule et une réorganisation des points focaux d'adhésion. Par exemple, Di Palma et coll. (Guignandon, Akhouayri et al. 2003) ont réalisé une étude cinétique sur le développement des contacts focaux (marquage de la vinculine) lorsque les cellules ostéoblastiques sont soumises à une contrainte mécanique. Ils montrent que peu de temps après l'arrêt de la stimulation, le nombre de contacts focaux va d'abord augmenter puis à plus long terme, ils observent un regroupement de ces contacts qui vont former des amas, « clustering », et ainsi améliorer l'ancrage de la cellule à la surface du substrat. De plus lorsqu'on déplace un substrat recouvert de RGD et engagé dans le complexe RGD-intégrine-cytosquelette on observe une réorientation du cytosquelette du noyau et des nucléoles qui sont redistribués le long de l'axe principal du champ de force. Ces données suggèrent un lien physique direct entre les intégrines et le noyau. Ce lien direct existerait entre les intégrines et les chromosomes. Un stimulus physique serait rapidement transmis à l'intérieur de la cellule grâce à l'état précontraint de la cellule et pourrait moduler l'expression génique.

En résumé les forces mécaniques pourraient passer par les intégrines au niveau des points focaux d'adhésion pour être transmises au cytosquelette entraînant une réorganisation de celui-ci permettant ainsi une régulation de la forme de la cellule de son architecture interne et par

exemple une modification des synthèses protéiques de la matrice extracellulaire ou des facteurs de croissance.

➤ Les protéines matricielles et les facteurs de croissance

Les contraintes mécaniques d'ordre physiologique ou supra-physiologique sont capables de stimuler la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire des ostéoblastes. On observe une augmentation de la synthèse du collagène de type I et de l'ostéopontine (Kaspar, Seidl et al. 2000; You, Reilly et al. 2001; Zhu, Zhang et al. 2008). L'expression génique du collagène de type I augmente de manière amplitude dépendante (8000 à 32 000 $\mu\epsilon$) (Zhu, Zhang et al. 2009). Une autre étude pratiquant l'étirement uniaxial montre également une augmentation de l'expression du collagène de type I en fonction de l'amplitude : elle augmente de 13, 66 et 153 fois en réponse à des amplitudes de déformation de 30 000, 60 000 et 90 000 $\mu\epsilon$ (notons qu'il s'agit encore de contraintes supra-physiologiques) (Bhatt, Chang et al. 2007). Concernant la fibronectine, Carvalho et coll. (Carvalho, Bumann et al. 2002) démontrent une nette augmentation de son expression après stimulation mécanique. Di Palma et coll. (Di Palma, Chamson et al. 2004) vont plus loin et montrent non seulement une augmentation de l'expression de la fibronectine mais également une réorganisation de son réseau caractérisée par une diminution du nombre de fibres et leur épaississement lorsque les ostéoblastes sont soumis à une contrainte d'ordre physiologique. L'interprétation des résultats obtenus avec les autres protéines matricielles telles que la BSP est plus difficile. L'application d'un stress mécanique (déformation biaxiale, 13 000 $\mu\epsilon$, 0,25Hz) induit chez les ostéoblastes de poulet une stimulation de l'expression des BSP (Carvalho, Bumann et al. 2002) alors qu'une autre équipe (Meyer, Terodde et al. 2001) n'observe aucune modification de la synthèse de BSP (déformation par flexion 4 points, 2000 à 10 000 $\mu\epsilon$, 1Hz) dans des cultures d'ostéoblastes humains. Plus récemment, une étude sur la lignée ostéoblastique Saos-2 montre que l'augmentation de l'expression et de la protéine BSP dépend de la force de compression appliquée. Parmi les différentes forces testées (de 0.5 à 3.0 g/cm^2), seule celle de 1 g/cm^2 augmente significativement la synthèse de la BSP (Mitsui, Suzuki et al. 2005).

Les contraintes mécaniques de hautes amplitudes peuvent donc stimuler l'expression des protéines de la matrice extra-cellulaire. On peut néanmoins remarquer que les effets des contraintes sur l'organisation des protéines matricielles ont été très peu étudiés. Cette organisation joue certainement un rôle très important pour l'enchâssement ou la libération des facteurs de croissances piégés dans la matrice.

Une contrainte uniaxiale permet une forte augmentation de l'expression du VEGF total (32 fois) et une augmentation plus modérée du FGF-2 (2,6 fois) (Bhatt, Chang et al. 2007). Récemment, Faure et al. (Faure, Linossier et al. 2008) ont démontré que l'expression du VEGF, était régulée par la fréquence d'étirement des cellules ostéoblastiques (10 000 $\mu\epsilon$). En effet, la régulation des isoformes solubles ou matricielles se fait différemment selon le régime de contrainte appliqué. Les basses fréquences (0,05Hz) augmentent l'isoforme soluble du VEGF alors que les hautes fréquences (5Hz) vont augmenter les protéines matricielles. Là encore ces études concernant les facteurs de croissance ne se sont intéressées qu'à des amplitudes de contraintes supra-physiologique (10 000 à 90 000 $\mu\epsilon$).

Concernant les effets des stimuli BAHF sur les protéines matricielles, il n'y a pas de résultats connus à ce jour sur les cellules ostéoblastiques. Un travail très récent (Wolchok, Brokopp et al. 2009) sur des fibroblasts de larynx a étudié les effets de stimuli vibrationnels de 100 Hz appliqués durant 14min/j et pendant 21 jours. Les cordes vocales vibrant entre 100 et 200Hz, ces vibrations miment l'environnement mécanique naturel des fibroblastes du larynx. Sous BAHF, la production de MEC *in vitro*, notamment celle du collagène de type I et de la fibronectine, est augmentée.

IV. CULTURES OSTEOBLASTIQUES 2D SOUS STIMULATIONS ELECTRIQUES

Le champ électrique est l'expression des forces qui résulteraient de l'action à distance de particules électriquement chargées (électrodes des dispositifs) sur une particule test, divisée par la valeur de la charge de cette particule test, de même que le champ gravitationnel par exemple résulte de l'action de particules dotées de masse. Le champ électrique est représenté par un champ vectoriel qui à tout point de l'espace associe une direction, un sens, et une norme correspondant à la valeur du champ électrique exprimée en volt par mètre (V/m) qui dérive du potentiel électrique.

In vitro, il existe peu d'études récentes montrant les effets d'un champ électrique sur le comportement cellulaire et elles exposent des résultats très différents selon le type de dispositif qui applique le champ électrique, les modalités du champ et les types cellulaires (McCaig, Rajnicek et al. 2005).

IV.1. Les dispositifs d'application des stimulations électriques

IV.1.1. Les dispositifs de stimulation électrique avec une intensité de courant

➤ Les électrodes en contact direct avec le milieu de culture [Figure 31](#)

Certains dispositifs possèdent des électrodes en contact direct avec le milieu de culture, celui-ci contenant des molécules chargées (ions), la différence de potentiel appliquée aux bornes des électrodes va induire un courant électrique. En effet, les liquides dans lesquels sont présents des électrolytes dissociés, c'est-à-dire des substances qui, en solution, se décomposent en ions positifs (cations) et négatifs (anions), sont de bons conducteurs du courant. Si on immerge dans de telles solutions électrolytiques deux plaques métalliques (électrodes), auxquelles on applique une différence de potentiel, il se crée dans le liquide un champ électrique qui fait se déplacer les ions négatifs et positifs vers les électrodes, respectivement positive et négative. On crée ainsi un courant électrique (courant ionique) dirigé de l'anode vers la cathode, l'intensité du courant est en général proportionnelle à la différence de potentiel. Ainsi, si un tel dispositif est utilisé avec une tension continue aux bornes des électrodes, on crée une électrolyse qui induit de nombreuses conséquences : accumulation de protéines chargées au niveau des électrodes, libération de peroxyde d'hydrogène, d'hydroxyle et d'ions oxygène, changement de PH, changement de température (effet joule)...

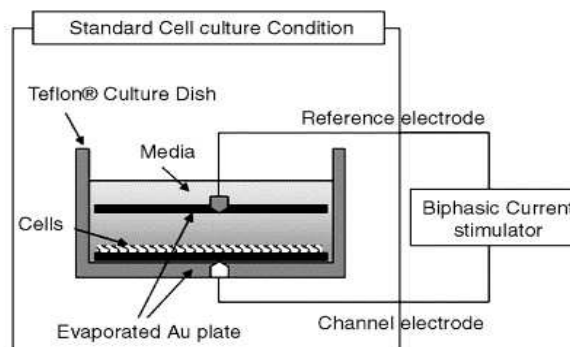


Figure 31 : Dispositif d'application d'un champ électrique perpendiculairement à la culture cellulaire induisant un courant électrique (Kim, Song et al. 2006)

Pour éviter une partie de ces problèmes, des dispositifs en mode pulsatile très haute fréquence (3000Hz) (Kim, Song et al. 2006) sont proposés, de sorte que les molécules chargées n'aient pas le temps de s'accumuler vers les électrodes. Dans cette étude l'intensité du courant est de $1,5\mu\text{A}/\text{cm}^2$, les durées d'application sont longues : 6 à 24 heures par jour. Des temps

d'application aussi longs peuvent engendrer une augmentation de la température du milieu de culture (effet joule) proportionnelle au carré de la densité de courant. Plus le temps d'application sera long, plus l'augmentation de température du milieu de culture sera importante et aura des conséquences sur les analyses. Dans une nouvelle étude, la même équipe (Kim, Song et al. 2009) utilise un dispositif similaire mais les durées d'applications sont très brèves (25 à 250 μ secondes). Cependant, ils travaillent avec une intensité de courant un peu plus importante que dans l'étude précédente de 1.5 à 15 μ A/ cm^2 .

Ainsi, ces dispositifs obligent à travailler à haute fréquence et à trouver un compromis entre la durée d'application de la stimulation électrique et l'intensité de courant. Pour éviter les problèmes causés par des électrodes métalliques plongées directement dans le milieu, d'autres dispositifs ont été proposés.

► Les électrodes en contact indirect avec le milieu de culture [Figure 32](#), [Figure 33](#)

Un dispositif avec des électrodes en contact indirect a été décrit dans Nature Protocols (Song, Gu et al. 2007) [Figure 32](#), ce système ou des systèmes similaires [Figure 33](#) ont été utilisés dans plusieurs études (Nuccitelli 2003; Curtze, Dembo et al. 2004).

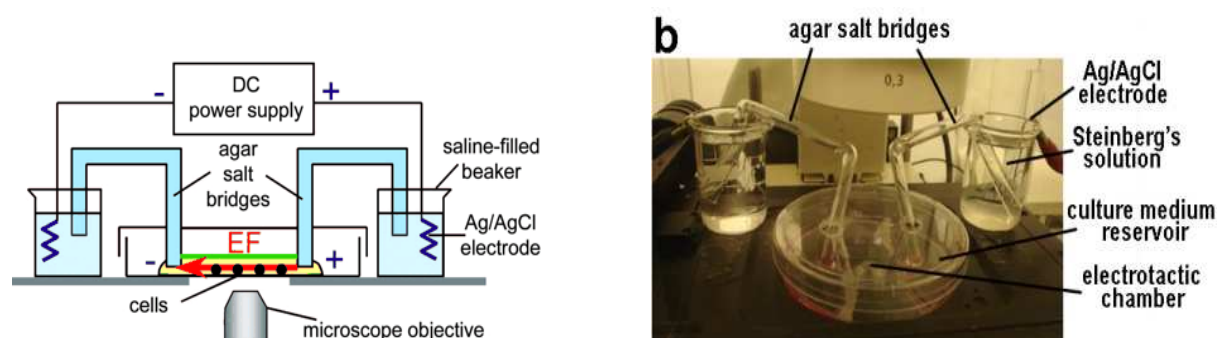


Figure 32 : Chambre de culture pour stimulation électrique parallèle à la culture cellulaire (Song, Gu et al. 2007)

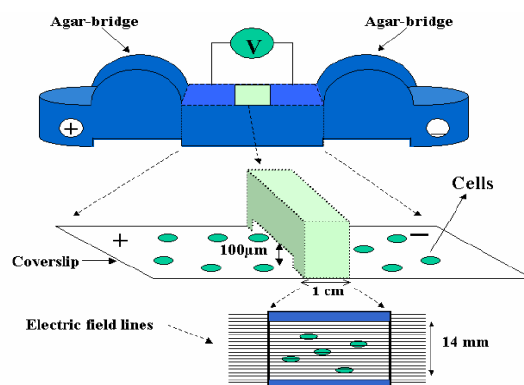


Figure 33 : Chambre de culture pour stimulation électrique parallèle à la culture cellulaire (Mendoza 2003; Curtze, Dembo et al. 2004)

Ces chambres de culture ont une géométrie définie qui permet de calculer et de contrôler facilement le champ électrique généré. La hauteur de ces chambres est très faible ($\approx 400\text{ }\mu\text{m}$), cela permet de maximiser la résistance de la chambre. En augmentant la résistance, le flux de courant traversant la chambre est diminué et par conséquent l'effet joule est minimisé. En effet, il y a très peu de changements de température ($+0.5^{\circ}\text{C}$) après une exposition à un champ électrique de 250mV/mm pendant 5 heures. Le pH est également très peu affecté ($+0.5$). D'autre part, chaque électrode est connectée via une solution saline à un pont salin en gel d'agar qui est en contact avec le milieu de culture. Ce système permet d'isoler la culture des potentiels produits toxiques qui se dégageraient des électrodes mais il n'empêche pas la création d'un courant électrique.

Avec ce type de dispositif, le champ électrique semble bien contrôlé, cependant, les études biologiques nécessitant des techniques de biologie moléculaire ou les dosages biochimiques sont difficiles étant donné la petite dimension de la surface analysable ($\approx 1\text{cm}^2$) et le nombre d'échantillons disponibles. Certains de ces dispositifs utilisent une pompe pour faire circuler le milieu de culture et ainsi éliminer les déchets, éviter le changement de pH et l'augmentation de température [Figure 34](#). Cependant, connaissant les effets des forces de cisaillement sur les cultures cellulaires, on se demande quelle est l'influence de ce flux liquidien et les biais expérimentaux qu'il peut entraîner.

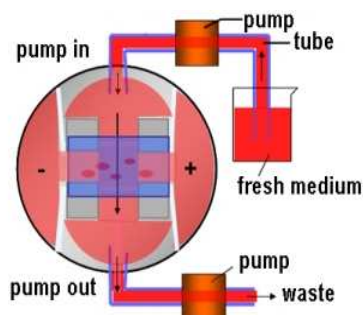


Figure 34 : Chambre de culture pour stimulation électrique avec renouvellement du milieu de culture
(Song, Gu et al. 2007)

IV.1.2. Les dispositifs de stimulation électrique sans intensité de courant

Un courant électrique traverse facilement les matériaux qui possèdent beaucoup de porteurs de charge libres (matériaux dits conducteurs), en revanche il traverse très difficilement ceux qui ne possèdent pas de charges libres ou très peu (matériaux dits isolants ou diélectriques).

Les dispositifs de stimulation électrique sans intensité de courant ont au moins une des électrodes en dehors du milieu de culture, en contact soit avec l'air ambiant soit avec le support de culture [Figure 35](#). L'air étant un excellent isolant, c'est seulement au-delà d'un certain seuil, que les électrons peuvent être arrachés aux atomes, ces derniers deviennent alors des particules ionisées ou ions. Pour l'air sec, ce seuil (ou rigidité électrique) est de 36 000 V/cm, pour un air saturé en humidité, cette valeur peut tomber à 10 000 V/cm. Le polystyrène qui compose la boîte de culture est un excellent isolant, sa rigidité électrique étant de l'ordre de 400 000 V/cm. Les valeurs de champ électrique utilisées dans les études sur les cultures cellulaires sont largement en dessous de ces seuils, ainsi avec ce type de dispositif les cellules ne sont pas traversées par un courant électrique. Dans l'étude de Wiesmann (Wiesmann, Hartig et al. 2001), les auteurs travaillent avec une tension (100V) pulsatile (16Hz) et distinguent deux modes : le mode dit "capacitif" où les deux électrodes sont en dehors du milieu de culture et le mode dit "semi capacitif" où une des deux électrodes est en contact avec le milieu de culture [Figure 35](#).

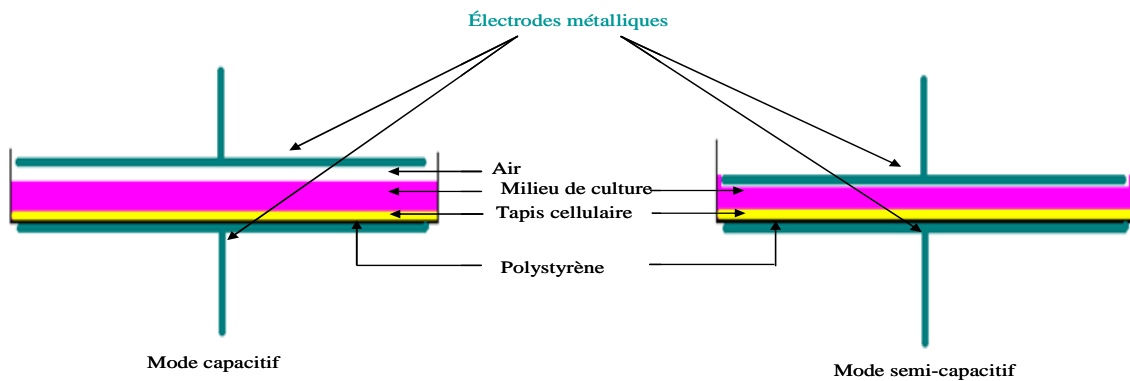


Figure 35 : Dispositifs de stimulation électrique d'après Wiesmann (Wiesmann, Hartig et al. 2001)

Ces deux systèmes sont modélisés par les résistances et capacités correspondant à chaque couche : (air), milieu de culture, tapis cellulaire et polystyrène [Figure 36](#).

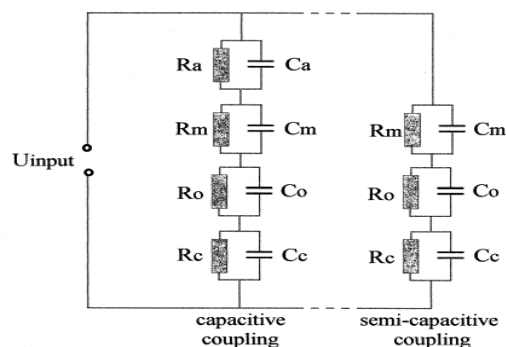


Figure 36 : Circuits correspondants au mode capacitif ou semi-capacitif (Wiesmann, Hartig et al. 2001)
(R=Résistance, C=capacité). Air (R_a , C_a), milieu de culture (R_m , C_m), tapis cellulaire (R_o , C_o), polystyrène (R_c , C_c)

En utilisant ces circuits comme modèles, pour une tension de 100V, un calcul théorique montre que tapis cellulaire serait soumis à un champ électrique de 6kV/m pour le mode capacitif et 21kV/m pour le mode semi-capacitif.

Ces dispositifs ont l'avantage de n'appliquer que le champ électrique sans passage de courant électrique. Cependant, ils ne peuvent solliciter qu'une boîte de culture à la fois.

IV.2. Réponses des ostéoblastes aux stimulations électriques

Les effets bénéfiques de l'électrostimulation sur l'ostéogénèse sont reconnus *in vivo*, et utilisés comme traitement pour améliorer la réparation fracturaire. En revanche, les effets directs sur les cellules osseuses sont encore mal connus, peu d'études récentes *in vitro* se sont intéressées aux mécanismes cellulaires et moléculaires affectés par les champs électriques.

IV.2.1. La prolifération et la différenciation cellulaire

Hartig (Hartig, Joos et al. 2000) en 2000, a appliqué un champ électrique en mode capacitif pulsé à une culture ostéoblastique primaire. La fréquence des pulses est de 16Hz et le voltage externe de 100V, ce qui, d'après leur calcul théorique, correspond à un champ électrique de 6 kV/m au niveau de la membrane plasmique des cellules. Sur une culture sub-confluente, il montre que ce champ électrique augmente la prolifération cellulaire et la différenciation ostéoblastique (activité PAL augmentée). Sur une culture confluente, la synthèse des protéines matricielles est augmentée. La même équipe révèle également l'influence d'un tel champ électrique sur la minéralisation ostéoblastique (Wiesmann, Hartig et al. 2001).

Les effets du champ électrique sur la prolifération cellulaire ont également été démontrés avec d'autres modalités de stimulation électriques. Un champ électrique sinusoïdal de 20mV/cm et de fréquence 60kHz (avec une intensité de courant donnée à 300μA) active la prolifération des ostéoblastes MC3T3-E1 ($\approx +15\%$) (Zhuang, Wang et al. 1997). D'autres (Kim, Song et al. 2006) utilisant un mode pulsatile à 3000Hz avec une densité de courant de 1,5μA/cm² montrent une augmentation de 30% de la prolifération d'ostéoblastes issus de calvaria de rat. Dans cette étude l'augmentation de la prolifération est observée pour une stimulation de 24h/j pendant 2 jours alors qu'elle n'est pas affectée avec une durée de 6h/j. Une étude dose réponse (Naegele, Lipari et al. 1991) avec des champs croissants de 1, 10, 100 et

625 mV/cm montrent que la prolifération ostéoblastique n'est affectée que pour les hautes amplitudes de champ électrique (soit 625mV/cm). De la même manière, l'adhérence des MG63 est augmentée seulement pour les deux plus hautes amplitudes de champ électrique (soit 100 et 625mV/cm). Ainsi, la durée et l'amplitude du champ affectent la réponse des cellules ostéoblastique notamment en terme de prolifération et d'adhérence.

En ce qui concerne la différenciation ostéoblastique, la littérature récente relate surtout les effets des champs électromagnétiques (champ électrique + champ magnétique) (Tsai, Chang et al. 2007). Le champ magnétique est induit par un courant électrique, son intensité est exprimée en Tesla (flux d'induction magnétique). Martino et al. (Martino, Belchenko et al. 2008) ont étudié les réponses cellulaires à un champ électromagnétique pulsé (15Hz), ce qui correspond à un champ électrique de 0.009V/cm (à 2 cm du centre de la boîte de culture) à 0.0225V/cm (5 cm du centre). Cette stimulation est appliquée 4h par jour pendant 1, 2 et 3 jours. La viabilité cellulaire n'est pas affectée mais l'activité PAL et la formation de nodules minéralisés sont augmentées. Une étude qui s'est attachée à séparer les effets du champ électrique pur de ceux du champ magnétique montre que l'activité PAL est induite et stimulée par le champ électrique (2mV/m, 30Hz) alors qu'elle ne l'est pas par le champ magnétique seul (30 Hz, 1.8 milliTesla) (Vander Molen, Donahue et al. 2000).

IV.2.2. La migration et l'orientation cellulaire

Lorsqu'on applique des champs électriques continus et parallèles à une culture cellulaire on constate des migrations directionnelles dépendantes du type cellulaire. Des cellules provenant d'un même tissu peuvent migrer dans des directions opposées. Par exemple, les cellules épithéliales de cornée et les ostéoblastes vont migrer vers la cathode alors que les fibroblastes stromal de cornée et les ostéoclastes vont migrer vers l'anode (Ferrier, Ross et al. 1986) (Soong, Parkinson et al. 1990). La migration avec extension des lamellipodes des cellules endothéliales se fait en direction de l'anode à une vitesse constante de 1-2µm/h (Zhao, Bai et al. 2004). Sous l'action d'un champ électrique identique, les fibroblastes s'orientent perpendiculairement au champ alors que les CSMs ne prennent pas d'orientation particulière (Sun, Titushkin et al. 2006). Ainsi, la réponse des cellules aux champs électriques doit fortement dépendre de leur lignage et des champs endogènes auxquels elles sont soumises au cours du développement ou des processus de régénération, c'est pourquoi nous commençons à peine à comprendre ces mécanismes complexes et pleins de subtilités.

La migration directionnelle des cellules dans un champ électrique (électrotaxie ou galvanotaxie) est comparable à un phénomène déjà bien connu, la chimotaxie (migration cellulaire selon un gradient de molécules) [Figure 37](#). Dans la chimotaxie, un gradient de ligand stimule l'activation de plusieurs récepteurs membranaires d'un côté de la cellule et de très peu de récepteurs de l'autre côté. De ce fait la signalisation intracellulaire va être plus forte d'un côté de la cellule par rapport à l'autre, la cellule va alors migrer selon le gradient de ligand [Figure 37A](#). Dans l'électrotaxie, on observe également un signal asymétrique mais il résulte de l'augmentation de la densité de certains récepteurs membranaires (cela dépend de leur charge) du côté de la cellule faisant face à la cathode (ou à l'anode) [Figure 37B](#). De la même manière que dans la chimotaxie, ce signal asymétrique va déclencher une migration directionnelle.

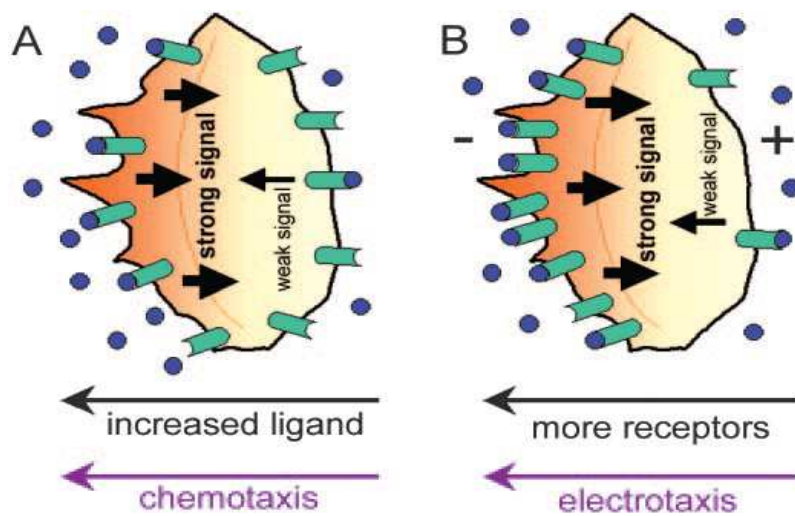


Figure 37 : Modèles de chimotaxie (A) et d'électrotaxie (B) d'après McCaig 2005

Cependant, l'électrotaxie ne fait pas intervenir les mêmes récepteurs que la chimotaxie. *Dictyostelium discoideum* (amibe) migre vers la cathode lorsqu'on applique un champ électrique continu de 3V/cm à 20 V/cm. La réorientation des cellules et la vitesse de leurs mouvements sont voltages dépendants. La mutation des récepteurs AMPc1 et 3, de Gα2 et Gβ, indispensables pour la chimotaxie (mécanisme clairement connu chez *Dictyostelium*), n'empêche pas la migration directionnelle vers la cathode, elles n'ont donc pas de rôle dans le phénomène d'électrotaxie (Zhao, Jin et al. 2002; Zhao 2009). Pour prendre un exemple précis du mécanisme d'électrotaxie, chez des fibroblastes (Brown and Loew 1994), un champ électrique continu (4V/cm) provoque une redistribution latérale des glycoprotéines de la membrane plasmique : les récepteurs concanavalin A et des amas d'intégrines se redistribuent du côté cathodique. Ainsi, le champ électrique va diriger la locomotion des fibroblastes via une redistribution des glycoprotéines impliquées dans l'adhésion de ces cellules au substrat.

D'autre part, le cytosquelette d'actine, impliqué dans la migration via la formation de lamellipodes est lui aussi affecté par le champ électrique. Les cellules endothéliales (Li and Kolega 2002) migrent vers la cathode quand on applique un champ électrique continu. Le seuil de réponse se situe à 1-2 V/cm. A 5 et 10 V/cm, 100% des cellules s'orientent et migrent. Dès 15 minutes d'application du champ électrique, on observe la formation de lamellipodes en direction de la cathode. L'actine F est distribuée de façon asymétrique dans le cytoplasme : on observe une accumulation du côté de la cathode. En outre, il est connu que des filaments d'actine et des microtubules isolés s'orientent parallèlement à la direction du champ électrique extérieur (Arsenault, Zhao et al. 2007; Kim, Kao et al. 2007). L'orientation des structures du cytosquelette sous champ électrique dépend de nombreux facteurs. Finkelstein et al. (Finkelstein, Chang et al. 2004) montrent, chez des fibroblastes, que les microfilaments sont indispensables à la migration dans le champ électrique alors que les microtubules n'ont pas de rôle, ils restent stables et ne se réorientent pas par rapport au champ. Les intégrines, intimement liées au cytosquelette, sont elles aussi affectées par un champ électrique (1V/cm, basse fréquence), elles pourraient, comme dans la réponse à la contrainte mécanique, agir comme des mécanosenseurs de la force induite par le champ électrique sur la cellule (Hart 2006; Hart 2008; Hart 2009).

L'électrotaxie implique une polarisation cellulaire, celle-ci est notamment révélée par la polarisation de l'appareil de Golgi. Un champ électrique continu de 3V/cm appliqué à des cellules CHO (Cellules d'ovaire de Hamster chinois) induit une polarisation du golgi et dirige la migration cellulaire. 80% des cellules sont polarisées après 5 heures de stimulation électrique. La polymérisation de l'actine est indispensable pour la polarisation du golgi, cette polarisation passe par des voies de signalisation impliquant la PI 3-kinase et src (Pu and Zhao 2005). Les Rho GTPases (ROCK, cdc42, Rac1) sont elles aussi impliquées dans la migration cellulaire et la polarisation du golgi.

Selon les types cellulaires et les modalités de champ, l'orientation du grand axe des cellules peut être parallèle ou perpendiculaire à la direction du champ électrique mais la majorité des études relatent plutôt une orientation perpendiculaire au champ. Par exemple, les cellules épithéliales de cornée vont se diviser perpendiculairement au vecteur champ électrique (1.5V/cm, durée 20h) (Zhao, Forrester et al. 1999). L'orientation des cellules endothéliales perpendiculairement au champ électrique (0.75 à 1 V/cm) est visible à partir de 8h de stimulation (Zhao, Bai et al. 2004). En ce qui concerne les cellules ostéoblastiques, Curtze (Curtze, Dembo et al. 2004) a observé, dès 3h de stimulation, un allongement et un réalignement des cellules (ostéoblastes primaires bovin et MG-63) perpendiculairement à un

champ électrique continu (10V/cm). Plus le champ est important (5V/m à 20V/m) plus le temps de réalignement et d'élongation est court. Entre 30 et 90 secondes de stimulation on observe des forces de traction qui induisent la rétraction de la cellule parallèlement à la direction du champ électrique. Entre 90 et 600 secondes, les forces de traction permettent l'élongation de la cellule perpendiculairement à la direction du champ électrique. Selon l'orientation des ostéoblastes par rapport au champ électrique, une étude note des différences morphologiques (Lee and McLeod 2000). Des MCT3T3-E1 ont été exposées 24h à un champ électrique de 60Hz, 0,5mV et un champ magnétique de 0,7mT immédiatement après l'ensemencement. Si on ne tient pas compte de l'orientation des cellules, les ostéoblastes exposés au champ ont une taille plus petite mais ne montrent pas d'autre différence morphologique par rapport aux cellules témoins. Si on tient compte de l'orientation, les cellules orientées parallèlement au champ électrique (et perpendiculairement au champ magnétique) ont une longueur plus petite et sont plus rondes.

Enfin, l'orientation de certaines protéines matricielles comme les fibres de collagène peut être influencée par le champ électrique. Il faut par exemple un champ électrique de 4000 V/cm pour orienter une fibre de collagène de 0,9 μm de long (Jaffe and Nuccitelli 1977).

Un champ électrique continu peut donc induire une migration directionnelle et une réorientation cellulaire en agissant notamment sur la redistribution des récepteurs membranaires, sur les composants du cytosquelette ou encore sur l'orientation de certaines protéines matricielles.

IV.2.3. La production de messagers secondaires : NO et Ca^{2+}

L'oxyde nitrique (NO) et le calcium (Ca^{2+}) sont des médiateurs importants et précoces de la réponse ostéoblastique à un stimulus, ils ont notamment été beaucoup étudiés dans les mécanismes de réponse à la contrainte mécanique (Zaman, Pitsillides et al. 1999; Adachi, Sato et al. 2003; Bacabac, Smit et al. 2006). Certaines études commencent à montrer que la réponse des ostéoblastes au champ électrique passerait également par ces messagers secondaires. L'application d'un champ électrique alternatif (sinusoïde 1Hz) de 2V/cm sur une culture ostéoblastique double la sécrétion d'oxyde nitrique (NO) avec une augmentation lente sur 60 minutes. Plus la fréquence augmente (1Hz, 10hz, 100hz) plus la sécrétion de NO diminue, la fréquence de 1Hz est donc optimale et le seuil de réponse se situe à 0.5V/cm. La stimulation électrique induit l'activation (calcium indépendante) des NO synthases inductibles (iNOS) (Hamed, Kim et al. 2006). Une stimulation électrique d'ordre physiologique (1-2 V/cm)

augmente de 45 fois le taux de calcium intracellulaire dans un délai de 20 minutes (Khatib, Golan et al. 2004). Ce champ électrique physiologique n'active pas les canaux calcium voltage dépendant directement, mais stimule la phospholipase C couplée aux récepteurs membranaires, ce sont les canaux calcium répondant à l'étirement (stretch-activated cation channel (SACC)) qui sont stimulés. Dans une autre étude, également sur les ostéoblastes (Curtze, Dembo et al. 2004), un champ de 10 V/cm provoque une libération immédiate du calcium intracellulaire, dans ce cas ce sont les canaux voltage dépendants (VGCC) qui sont directement activés : l'augmentation du calcium intracellulaire a lieu 85 secondes après l'application du champ électrique. Ainsi, un champ de 2V/cm n'est pas capable d'activer directement l'ouverture des canaux calcium alors qu'un champ plus important, de 10V/cm, va induire une modification du potentiel de membrane et donc stimuler les canaux calcium.

De ces études, il ressort que la fréquence et l'amplitude sont deux paramètres du champ électrique qui peuvent influencer les réponses cellulaires.

IV.2.4. La production de facteurs de croissance

La sécrétion de ces messagers secondaires va induire des effets sur la production de facteurs de croissance. Un champ électrique de 60kHz (signal sinusoïdal), 20mV/cm, 300μA, active la prolifération des ostéoblastes (MC3T3-E1) et augmente l'expression du TGF-beta1. Si on bloque les canaux calcium voltage dépendants, on empêche la stimulation de la prolifération par le champ électrique ainsi que l'augmentation de l'ARNm du TGF-beta1 (Zhuang, Wang et al. 1997). Le TGF-beta1 est un facteur important impliqué dans la migration des ostéoblastes, l'augmentation d'ostéopontine, de collagène ou d'autres facteurs de croissance (PDGF, M-CSF). Kim et al. (Kim, Song et al. 2006) montrent dans des cultures ostéoblastiques une augmentation de l'expression génique de 2 isoformes du VEGF (188 et 164) ainsi que de la protéine après 6h ou 24h de stimulation par jour pendant 2 ou 4 jours (mode pulsatile direct : 3000Hz, 1,5μA/cm²). L'expression et la protéine HIF1alpha n'est pas modifiée par le champ électrique ce qui montre que l'augmentation du VEGF par le champ électrique n'est pas due à un phénomène d'hypoxie. Par ailleurs, on peut noter que les expressions des ARNm marqueurs de la différenciation ostéoblastique tels que la PAL, le collagène, l'OPN ou osterix ne sont pas modifiées significativement, en revanche, l'expression de Cbfa1 diminue de 50% après stimulation. Ils ne trouvent pas de modification de l'expression des autres facteurs de croissance tels que BMP-2, BMP-4, IGF-2 et TGF-B1. Une autre étude relate une augmentation de la production du VEGF lorsque des cellules endothéliales sont soumises à un

champ électrique continu de 0.75 à 1V/cm (Zhao, Bai et al. 2004). Dans cette même étude l'orientation des cellules perpendiculairement au champ est visible à partir de 8h de stimulation. L'inhibition des récepteurs 1 et 2 du VEGF empêche la réorientation des cellules perpendiculairement au champ (1V/cm 72h). Cette réorientation passe en partie par la voie de signalisation VEGFR, PI3K- Akt et Rho les Rho GTPases.

OBJECTIFS

Lors des activités physiques à impact (dites ostéogéniques) l'os est soumis à plusieurs types de stimulations : des contraintes mécaniques avec différentes modalités d'amplitude et de fréquence mais également, en synergie, des potentiels électriques. Partant de ce constat physiologique, l'objectif principal de cette thèse a été de montrer *in vitro* que la promotion de l'ostéogénèse n'est pas le résultat d'un seul type de stimulus physique mais de la combinaison de plusieurs signaux mécaniques et/ou électriques. Nous avons voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle l'effet d'une contrainte mécanique peut être potentialisée par l'ajout d'un autre type de stimulation pour favoriser l'activité ostéoblastique. La perspective à plus long terme serait d'utiliser ce type de stimulations pour améliorer l'ostéointégration des biomatériaux. C'est pourquoi nos analyses ont porté principalement sur les deux composants essentiels pour le succès de la greffe d'un biomatériau : la matrice extracellulaire qui sert d'interface entre le biomatériau et l'hôte ainsi que les facteurs angiogéniques qui assurent la vascularisation de l'implant.

La première partie de cette thèse s'est orientée sur les effets des contraintes mécaniques en compression appliquées à des céramiques 3D cellularisées. Ce modèle de microenvironnement 3D permet de se rapprocher de la réalité physiologique de *l'in vivo*. Nous avons choisi de travailler avec des contraintes de faible amplitude, en se plaçant dans des grandeurs d'ordre physiologique (maximum 1000 $\mu\epsilon$) car elles sont applicables à des biomatériaux ayant de faibles propriétés mécaniques. *In vivo*, lors de la locomotion, l'os est naturellement soumis aux contraintes en compression, il reçoit à la fois des contraintes basses fréquences mais également des BAHF. Ainsi, ces deux types de stimulations mécaniques sont présentes *in vivo*, ce qui laisse supposer que leur combinaison serait une stratégie pour améliorer l'ostéogénèse dans un modèle 3D de biomatériaux cellularisés par des ostéoblastes. Notre objectif était de définir une combinaison de signaux mécaniques basés sur des BAHF qui serait capable de potentialiser la synthèse matricielle des ostéoblastes.

Comme dans un matériau piézoélectrique, lorsque l'os *in vivo* est soumis à des déformations mécaniques, il se crée des potentiels électriques. Dans la deuxième partie, nous nous sommes donc intéressés à des signaux mécaniques et électriques typiquement produits par les matériaux piézoélectriques c'est-à-dire des stimuli extrêmement basse amplitude et très hautes fréquences. En suivant notre idée de potentialiser un signal par un autre, nous avons

testé un nouveau signal mécanique caractérisé par une très basse amplitude et haute fréquence mais cette fois dans le but de le combiner à un champ électrique.

Les effets des contraintes mécaniques de très faible amplitude et des fréquences si élevées n'ont jamais été étudiés et de même, les études utilisant le champ électrique sont difficilement interprétables étant donné l'hétérogénéité des modalités testées. Ainsi, il était tout d'abord nécessaire de connaître les effets propres de chaque type de stimulation (mécanique et électrique), nous les avons donc étudiés séparément sur des cultures cellulaires en deux dimensions.

Pour comprendre les effets des BAHF (μ DEF) générées par un matériau piézoélectrique, il était nécessaire de développer un système de contrainte adapté. Notre objectif était d'étudier les effets des très BAHF sur la production quantitative et qualitative de la MEC ainsi que sur le VEGF. Pour vérifier la qualité de la MEC synthétisée sous BAHF, son potentiel ostéogénique devait être évalué sur des cellules stromales pluripotentes murines (C3H10T1/2).

Dans le but de mettre en évidence les effets du champ électrique seul, nous avons testé plusieurs modalités d'applications, plusieurs dispositifs et enfin plusieurs types cellulaires en concentrant nos analyses sur les facteurs angiogéniques.

La dernière étape de cette partie était d'associer les deux types de stimulations étudiées précédemment avec pour objectif de mettre en évidence les améliorations apportées par cette double stimulation. L'idée était de « screener » les réponses sur les facteurs associés à l'angiogénèse. Cette recherche devait vérifier si l'ajout d'un champ électrique pouvait effectivement enrichir les effets matriciels des BAHF en augmentant la production de facteurs angiogéniques potentiellement intéressants pour l'ingénierie tissulaire osseuse.

V. RESULTATS

V.1. PREMIERE PARTIE : Réponses cellulaires à la combinaison de deux stimulations mécaniques

Article 1

The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression.

Dumas V. et coll.

Biomaterials 30 (2009) 3279–3288

➤Résumé de l'article 1

L'ingénierie tissulaire osseuse est une alternative prometteuse offrant des avantages significatifs par rapport aux greffes osseuses. Le succès du comblement d'un défaut osseux de grande taille repose sur la qualité et la rapidité de la repousse osseuse à l'intérieur du biomatériau implanté. Les substituts osseux les plus utilisés en chirurgie orthopédique sont les céramiques poreuses de phosphates de calcium. Il est connu que l'ostéoblaste s'adapte à la contrainte mécanique par une activité cellulaire dépendante du signal appliqué. Nous pensons que la contrainte mécanique est un outil capable d'optimiser le développement et l'intégration d'un tissu néoformé au sein d'un substitut osseux implantable.

On connaissait les effets positifs des signaux basses fréquences ($<3\text{Hz}$) moyennes amplitudes ($>1000\mu\epsilon$) aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et des études récentes montrent que des signaux hautes fréquences ($>10\text{Hz}$) basses amplitudes ($<300\mu\epsilon$) sont également capables d'induire une réponse ostéogénique. Dans cette étude la combinaison de ces deux types de signaux a été utilisée comme une stratégie pour améliorer l'ostéogénèse.

Nous proposons un modèle d'étude *in vitro* de culture ostéoblastique humaine (MG63) sur matériau implantable soumis à des contraintes mécaniques. Notre objectif a été d'améliorer les qualités du substitut osseux en optimisant sa cellularisation et en appliquant une contrainte mécanique comme facteur ostéogénique c'est à dire favorable au dépôt de matrice osseuse et à la production des facteurs angiogéniques, le signal étant à définir.

Une technique d'ensemencement a été mise au point afin d'assurer une colonisation homogène des biomatériaux d'hydroxyapatite 3D (Biocetis $h=4\text{mm}$, $\phi=10\text{mm}$, pores $\approx 500\mu\text{m}$).

Des sollicitations mécaniques en compression ont été générées par le système ZetOSTM (Jones D.B., 2003) qui permet de « designer » toute forme de signaux. Nous avons étudié un signal correspondant à une sinusoïdale basse fréquence (3Hz) pour une amplitude de $1000\mu\epsilon$ sur laquelle ont été superposées différentes des vibrations hautes fréquences (25 , 50 et 100Hz) basse amplitude ($200\mu\epsilon$). Nous avons quantifié l'ARNm du collagène, de la fibronectine et du VEGF et étudié en parallèle les protéines.

Le signal de 3Hz , sans ajout de vibration, augmente légèrement les expressions des ARNm du collagène et de la fibronectine. L'ajout de vibrations à 50 ou 100Hz diminue l'expression des protéines matricielles. En revanche, l'ajout de vibrations à 25Hz renforce l'effet de la contrainte sinusoïdale 3Hz . En effet, lorsque les ostéoblastes sont soumis à ce régime de contraintes combiné, les expressions des ARNm du collagène et de la fibronectine augmentent respectivement de $1,92$ et $1,62$ fois contre $1,30$ et $1,25$ fois pour le signal sinusoïdal 3Hz seul.

Le ARNm de l'isoforme matricielle du VEGF augmente de 1,5 fois grâce à ce signal combiné alors que l'isoforme soluble n'est pas affectée. Le collagène et le VEGF matriciel augmentent également significativement au niveau protéique. Si on s'intéresse à la MEC, la microscopie confocale montre une réorganisation du réseau de fibronectine, caractérisée par des fibres plus épaisses dans les cultures soumises au régime combiné 3Hz+25Hz.

Ainsi, ces résultats ont permis d'identifier un régime de stimulation mécanique en compression complexe capable d'augmenter l'expression de protéines majeures de la matrice du tissu osseux et du VEGF. Ce travail permet d'envisager la fonctionnalisation d'un substitut osseux cellularisé avant l'implantation grâce au type de régime mécanique complexe défini ici.



The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression

Virginie Dumas^{a,b}, Anthony Perrier^{a,b}, Luc Malaval^{a,b}, Norbert Laroche^{a,b}, Alain Guignandon^{a,b}, Laurence Vico^{a,b}, Aline Rattner^{a,b,*}

^a Université de Lyon F42023 Saint-Etienne France

^b INSERM U890, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, IFR143, F42023 Saint-Etienne France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2008

Accepted 28 February 2009

Available online 26 March 2009

Keywords:

Bone tissue engineering/osseointegration
Osteoblast

ECM (extracellular matrix)

Growth factors

Hydroxyapatite

Mechanical test/strain rate

ABSTRACT

As a strategy to optimise osteointegration of biomaterials by inducing proper extracellular matrix synthesis, and specifically angiogenic growth factor production and storage, we tested the effects of cyclic mechanical compression on 3D cultures of human osteoblast-like cells. MG-63 cells were seeded into 3D porous hydroxyapatite ceramics under vacuum to enable a homogenous cellular distribution. A four-day culture period allowed cell proliferation throughout the scaffolds. Low amplitude cyclic compressions were then applied to the scaffolds for 15 min with different regimens generated by the ZetOS™ system. A 3 Hz sinusoidal (sine) signal increased slightly collagen and fibronectin expression. When 50 Hz or 100 Hz vibrations were superimposed to the 3 Hz signal, matrix protein expression was down-regulated. In contrast, adding a 25 Hz vibration up-regulated significantly collagen and fibronectin. Moreover, expression of a matrix-bound variant of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) was specifically stimulated compared to control or 3 Hz sine, and non-soluble VEGF protein was increased. Our study enabled us to identify low-amplitude, high-frequency strain regimen able to increase major matrix proteins of bone tissue and to regulate the expression of VEGF variants, showing that an appropriate combined loading has the potential to functionalise cellularized bone-like constructs.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

One of the main criteria of clinical success in reconstructive bone surgery is to achieve good and fast osteointegration of the implant. To improve biomaterial scaffold qualities, a strategy is to preseed appropriate cells in a natural or synthetic scaffold in or onto which they will develop, organize, and behave as if they were in their native tissue. Many different types of biomaterials are being considered for use in the tissue engineering of bone. Synthetic ceramics provide a basis for correct tissue regeneration [1], and porous ceramic scaffolds including hydroxyapatite (HA) are commonly used in order to solve biological graft problems [2,3]. The geometry of the scaffold is also an important determinant to engineer functional tissue, as it must facilitate a spatially uniform

distribution of seeded cells as well as define and maintain a 3D space for the formation of a new tissue with appropriate structure. In addition, extracellular matrix (ECM) synthesis and vascularization are crucial for the success of a graft. The interactions between growth factors and ECM regulate cell behaviour in many ways. For instance, the direct binding of growth factors to the ECM can affect the local concentration as well as the biological activity of growth factors [4]. The ECM is able to limit the diffusion of soluble factors, and the biological effects of matrix-bound growth factors are dependent on their controlled release, hence of the dynamic composition of the matrix. In particular, the ECM acts as a reservoir for factors which regulate angiogenesis, a process in which vascular endothelial growth factor (VEGF) is the driving force [5]. The survival and functioning of a bone biomaterial require a rapid vascularization after implantation [6], when blood vessels attach and spread into the “new tissue” and the cells growing on the scaffold recreate the bone. To optimise this process, various strategies have been developed. For instance, the application of VEGF directly onto the biomaterial rapidly attracts endothelial cells and induces angiogenesis into the implant [7]. However, bone cells

* Corresponding author. INSERM U890, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, IFR143, 15 rue Ambroise Paré, F-42023 St-Etienne Cedex 2, France. Tel.: +33 4 77 42 14 42; fax: +33 4 77 57 55 72.

E-mail address: Aline.Rattner@univ-st-etienne.fr (A. Rattner).

themselves are able to produce the pro-angiogenic factor VEGF-A [8]. Also, it is known that cells of the osteoblast lineage sense and respond to various mechanical stimuli, and it has been shown that low-amplitude/high-frequency vibrations are anabolic for trabecular bone [9–12]. In the light of recent data showing that osteoblast VEGF-A production is modulated by mechanical strains [13–15] mechanical stimulation appears as a promising non-invasive approach for optimisation of implant characteristics.

Our aim of this study was to define appropriate mechanical stimulation regimens which would improve the qualities of bone-like constructs, and enable the development of functional bone-like tissue. Among the numerous variants of mechanical strain which have been applied to stimulate bone cells, compressive loading had been demonstrated to be osteogenic [16]. We applied short term compressive loading to cell-seeded three-dimensional (3D) ceramic scaffolds with different combinations of frequencies. In order to select the signals affecting osteoblastic cell behaviour, we investigated mRNA expression and protein in the production and organisation of proteins related to extracellular matrix and angiogenesis.

2. Materials and methods

2.1. 3D HAP scaffolds

Macro-porous scaffolds were provided by BIOCETIS (Boulogne-sur-mer, France). They are composed of pure $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, with 500 μm or 300 μm pore size, and a compressive strength >5 Mpa, measured on dry scaffolds according to the manufacturer. Their cylindrical geometry and dimensions ($h = 4$ mm, $\phi = 10$ mm) are adapted to the ZetOS™ compression chambers. Three scaffolds of each porosity were imaged in 3D with a micro-CT scanner (VIVA CT 40; Scanco Medical, Bruttisellen, Switzerland) at a 10 μm isotropic voxel size, with 2000 projections and an integration time of 300 ms, at 55 keV with a 177 mA current. Three-dimensional reconstructions were generated after thresholding with the following parameters: Sigma, 1.5; Support, 2; Threshold, 290. Using software designed for trabecular bone, we measured total porosity as the inverse of the ratio of the segmented ("Bone") volume to the total volume (1-BV/TV), and similarly strut number (as "trabecular number" = Tb.N), thickness (Tb.Th), separation (Tb.Sp), as well as the connectivity density (Conn.D) and the degree of anisotropy (DA) of the structure.

2.2. Cell culture inside 3D scaffolds

The human osteosarcoma cell line MG-63, considered to be representative of the osteoblast phenotype [17], was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Eurobio) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 U/ml penicillin (Sigma), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Sigma), and 10% foetal calf serum (FCS). For

scaffold seeding, osteoblasts were trypsinized at confluence and resuspended in culture medium (7.5×10^5 cells/ml). Scaffolds were immersed in the cell suspension and low pressure was applied with a vacuum pump for 3×1 min to remove the air bubbles. Scaffolds were maintained in the cell suspension for 2 h, and then moved to fresh culture medium supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid (Sigma). Scaffold cultures were carried out at 37 °C, 5% CO_2 for a 4-day period before loading.

2.3. The loading system

The ZetOS™ tissue culture system was built in Marburg Germany by Dr. David Jones (EOB, Phillips University) and Dr. Everett L. Smith (University of Wisconsin, Medical School Biogerontology, USA). A complete description is given in Ref. [18]. The ZetOS™ loading device was developed to exert cyclic compression on cancellous bone cylinders cultured in forced flow circumfusion chambers [19]. The force applied as well as sample deformation can be measured simultaneously during loading. In the present study, it was used to apply specific compressive strains to the cylinder-shaped scaffolds. At the time of loading, cell-seeded HAP cores were inserted aseptically in close fitting compression chambers, filled up with culture medium at 37 °C, whose tops and bottom were closed with a sapphire. The chambers were positioned in the loading device under a piezo-electric actuator (Fig. 1) Using a screw mechanism, a small static preload (5 N = 1 μm) was applied to the sample, to ensure that sapphire and biomaterial interfaces were put in contact. The force was then adjusted to zero before dynamic loading.

2.4. Strain regimens

The software allows dynamic loading of samples with various oscillation patterns such as standard sinusoidal, triangular, square or complex waveform. The built-in function generator also accepts input of a series of numbers to generate specific designed waveforms with a large frequency spectrum. We set the built-in function generator of the ZetOS™ device to generate sinusoidal signals with 4 different waveforms (Fig. 2). The simple signal was a sinusoidal wave, frequency 3 Hz, amplitude 4 μm added to 1 μm preload, named S_3 (Fig. 2A). Three combined signals were designed with the sinusoidal wave (S_3) and superimposed vibrations of 100 Hz (S_3V_{100} Fig. 2B), 50 Hz (S_3V_{50} Fig. 2C), or 25 Hz (S_3V_{25} Fig. 2D) frequency, amplitude <1.5 μm . All cultured scaffolds were subjected to a unique episode of 15 min compressive cyclic loading. Scaffolds were then replaced in fresh culture medium for different periods before harvesting. Scaffolds placed into chambers for the same duration but not subjected to strain served as controls.

2.5. MTT assay

The MTT assay was used to evaluate cell viability and population growth. 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) is converted by a mitochondrial enzyme, active only in living cells, to yield a dark blue/purple formazan product. The density of the product read at 540 nm is directly related to the number of viable cells. Standard curves were built with 2D MG-63 cell cultures. The scaffolds were incubated (37 °C, 5% CO_2) with 0.5 mg/ml MTT for 4 h, then 4 ml DMSO (Sigma) was added for crystal solubilisation before reading.

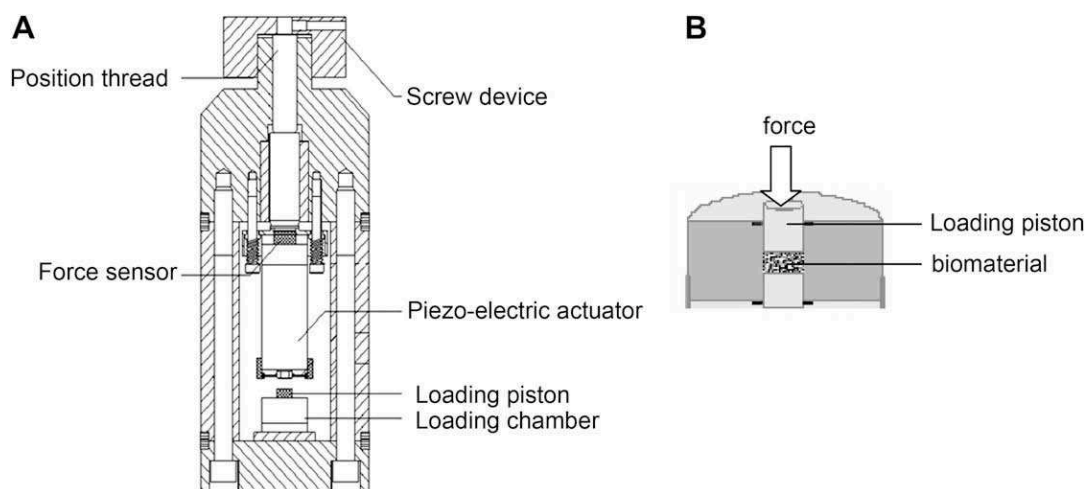


Fig. 1. The ZetOS™ loading system (described extensively by Jones et al. [18]). (A) At the top of the housing is a screw mechanism to raise and lower the actuator onto the chamber. It is used to induce a mechanical preload on the biomaterial. The ZetOS™ has a piezo-electric actuator with a built-in strain gauge sensor to measure the actuator's expansion. (B) A cross-section of a ZetOS™ loading chamber.

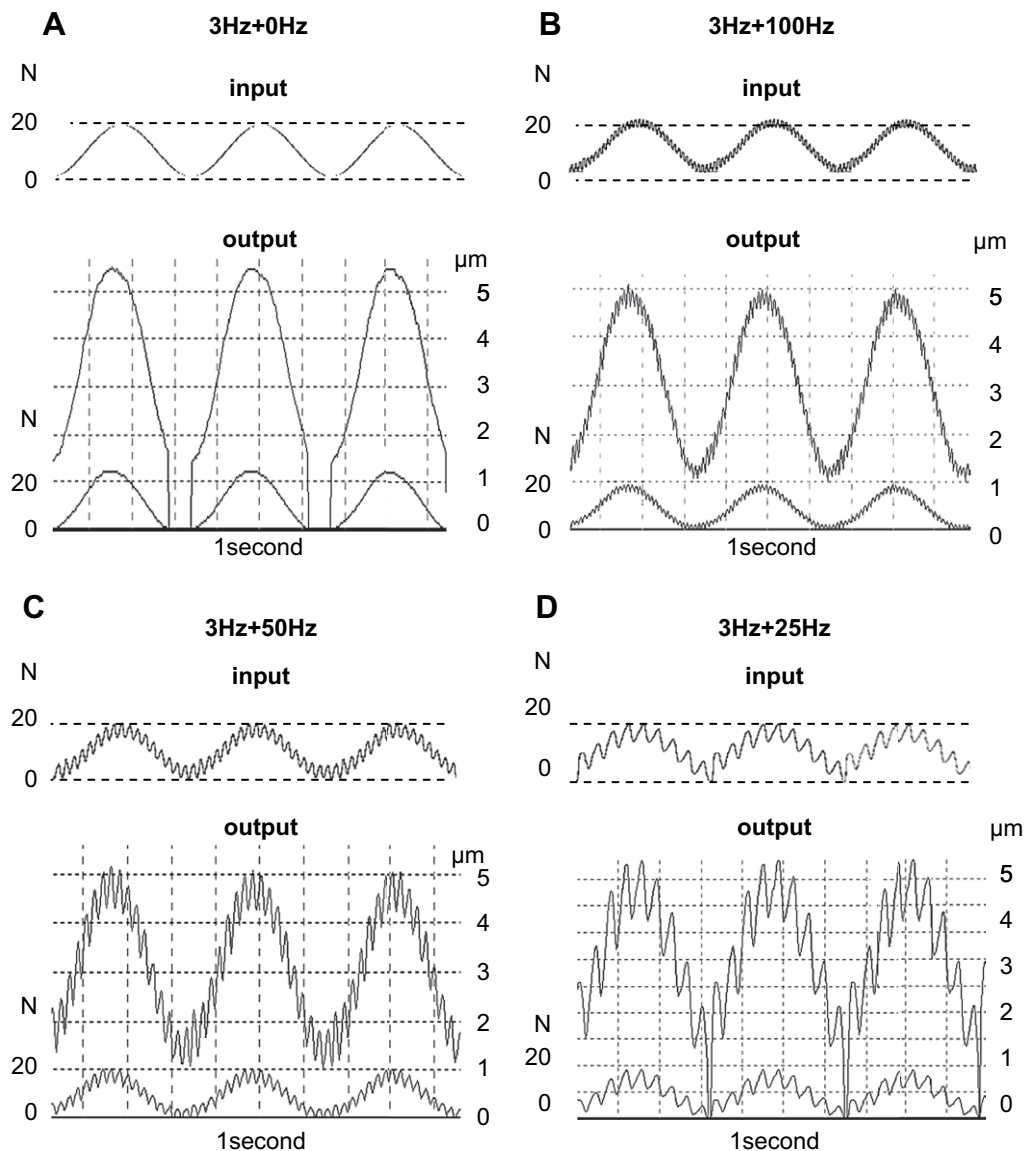


Fig. 2. Strain waveforms tested in the study. Upper graphs correspond to the input signal (in Newton: N). Lower graphs correspond to the output signal expressed in deformation (μm) for the higher curves and in Force (N) for the lower curves. To the basal sinusoidal wave (3 Hz, preload 1 μm , load 4 μm) = S_3 (A) were superimposed vibrations ($<1.5 \mu\text{m}$) of 100 Hz (B = S_3V_{100}), 50 Hz (C = S_3V_{50}) or 25 Hz (D = S_3V_{25}) frequency.

2.6. DAPI staining and counting of nuclei

Samples were rinsed in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X100 and incubated with 4',6 diamidine-2' phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma) for 20 min to label nuclei. The scaffolds were split into two to expose the central zone. Samples were examined with a Leitz DMRB fluorescence microscope. Images were acquired with a Roper Scientific CoolSnapfx camera using the Meta Imaging series 4.6.6. software. Images analysis was performed with the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). A threshold was applied to the DAPI image and the particle analyzer was used to identify and count stained nuclei in each image. Numbers of nuclei were normalized to the counting area (3.2 mm^2).

2.7. RNA extraction and RT

To isolate total RNA for quantitative RT-PCR scaffolds were crushed in lysis buffer (Roche, Hague Road, Indianapolis) with an RNase-free piston (Pellet), vortexed and spun. The clear cell lysate was transferred to QiaShredder (Qiagen, Inc., Valencia, CA) columns for RNA purification. RNase-Free DNase (Roche) was used to eliminate DNA contamination of RNA samples. Purified RNA was dissolved in RNase-free water and its concentration was assessed by reading at 260 nm. RNA quality was checked on a 2% agarose gel with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide. Samples were stored at -80°C until use. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 μg of total RNA with the 1st strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche, Hague Road, Indianapolis).

2.8. Quantitative real-time PCR

8 μl of cDNA mixture diluted 1:20 in water was subjected to real-time PCR using SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I, Roche, Penzberg, Germany). Reactions were performed in 20 μl PCR mixture containing 4 μl 5 \times Master Mix (dNTP mixture with dUTP instead of dTTP, MgCl_2 , SYBR Green I dye, Taq DNA Polymerase and reaction buffer), 2 μl of 10 μM primers. Primer sequences of type I collagen, fibronectin, VEGF189, VEGF165, and VEGF121 are listed in Table 1. Cyclophilin was used as a control; an RNA sample extracted from 2D MG-63 cell cultures was used to build the standard curves from 10-fold dilutions of total RNA. Amplified products were examined for size estimation on a 2% agarose gel with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide and DNA molecular weight marker. On a preliminary experiment, controls were done at each time point (4, 8, 12, 14 h) for collagen, fibronectin and VEGF. None of them changed over time (not shown). In the following experiments, only one control was run (at 8 h) for each parameter. Values are expressed as percent of 8 h control after normalization on cyclophilin values.

2.9. Immunoassays

Type I collagen production was assessed with C-terminal propeptide (C1CP) concentrations in the culture medium, measured with an ELISA kit (Metra Biosystems) according to the manufacturer's instructions. VEGF content was

Table 1
Oligonucleotides sequences used in real-time RT-PCR.

Genes	Forward	Reverse	PCR product size (pb)	Source
Cyclophilin	5' AGCTGTTTGC; AGACAAAGTT 3'	5'CCAAAGACCA; CATGCTTGCC 3'	322	AF022115
Fibronectin I	5'GGAGAACCAA; GACTGAGACG 3'	5'CTGTGATGGT; GTAGCTTCTG 3'	114	NM_212482
Collagen I	5'TGACCTCAAG; ATGTGCCACT 3'	5'ACCAGACATG; CCTCTTGCC 3'	197	NM_000088
VEGF 189	5'CCTGGAGCGT; TCCCTGTGGG 3'	5'CTCCTGCCCG; GCTCACGCC 3'	176	NM_003376
VEGF 165	5'CAAGAAAATC; CCTGTGGGC3'	5'CTCCTGCCCG; GCTCACGCC3'	175	NM_003376
VEGF121	5'GGACATCTTC; CAGGAGTACC3	5'GGCTTGTAC; ATTITTTCTTG3'	258	NM_003376

measured in culture medium (soluble VEGF) and in scaffold extracts with an ELISA kit (VEGF-human A, AbCys) according to the manufacturer's instructions. Scaffold extracts obtained by manual crushing in lysis buffer composed of PBS with 0.5% Nonidet 40, and 1% PIC (proteases inhibition cocktail, Sigma, St. Quentin fallavier, France). Each sample was run in duplicate in the assays. Data were corrected for fresh culture medium or fresh lysis buffer values, and normalized on the total protein content of the cell lysate measured with the BCA Protein Assay Kit (Interchim, Pierce).

Cell proliferation was controlled by DNA and protein assay 12 h and 48 h post-strain.

2.10. Fibronectin immunostaining

Cells were washed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature, permeabilized for 4 min by 0.1% Triton X100 in PBS, incubated for 2 h with rabbit anti-human-fibronectin (Sigma) diluted 1/100, and for 1 h with goat anti-rabbit alexa-fluor-488 (Invitrogen) diluted 1/250. Scaffolds were examined using a confocal microscope (LEICA TCS-SP2 – INVERSE). Image analysis was performed with the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). After background removal, thresholding, the mean area of fibres was calculated in control and strained conditions from 10 random field readings per sample.

2.11. Statistical analysis

Data were analysed with the STATISTICA6 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Group comparisons were performed with Kruskal–Wallis one-way analysis of variance. When p values were <0.05 , post hoc comparisons among individual samples were done with the Mann–Whitney test for unpaired samples with adjusted α value. All data are mean \pm SD of 4 independent cultures, except for RT-PCR of collagen and fibronectin ($N=3$).

3. Results

3.1. Biomaterial characterization

Three-dimensional μ CT imaging of the 300 and 500 μ m pore size scaffolds showed regularity in pore size and pore shape, spherical pores displaying good interconnectivity (Fig. 3A). Standard deviations for the quantitative parameters measured appeared to be minor (Fig. 3B) which showed a good reproducibility of the samples. Of note, strut separation, which can be taken as a measure of pore diameter, appears to be lower than announced (Fig. 3B). A comparison between HAP biomaterials of 300 μ m and 500 μ m pore size showed similar porosity (68 and 75% respectively). However, strut numbers and connectivity density were higher (respectively 2.5-folds and 6-folds) for 300 μ m pore size scaffolds and, conversely, strut thickness and separation were lower (respectively 2-folds and 2.5-folds). The degree of anisotropy (DA) close to 1 reflected non-oriented organisation in both scaffolds.

3.2. Cell density in seeded scaffolds

Cell nuclei were stained 4 h after seeding and again after 4 days to analyse spatial cellular distribution (Fig. 4A and B). For 500 μ m pore scaffolds, vacuum seeded scaffolds showed both homogenous osteoblast distribution and an efficient colonization of the biomaterial centre 4 h post-seeding which was not the case after direct

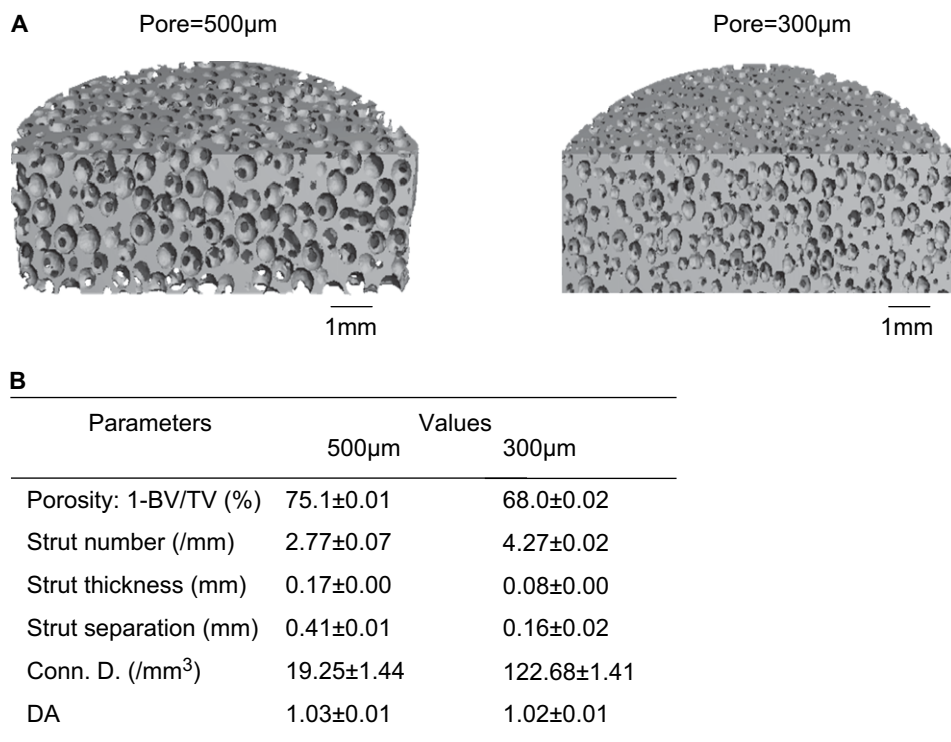


Fig. 3. Characterization of biomaterials. (A) Three-dimensional μ CT scans and (B) 3D quantitative characterization provided through microtomography (10 μ m resolution) of 500 μ m and 300 μ m pore size scaffolds (Conn.D: Connectivity density, and DA: degree of anisotropy).

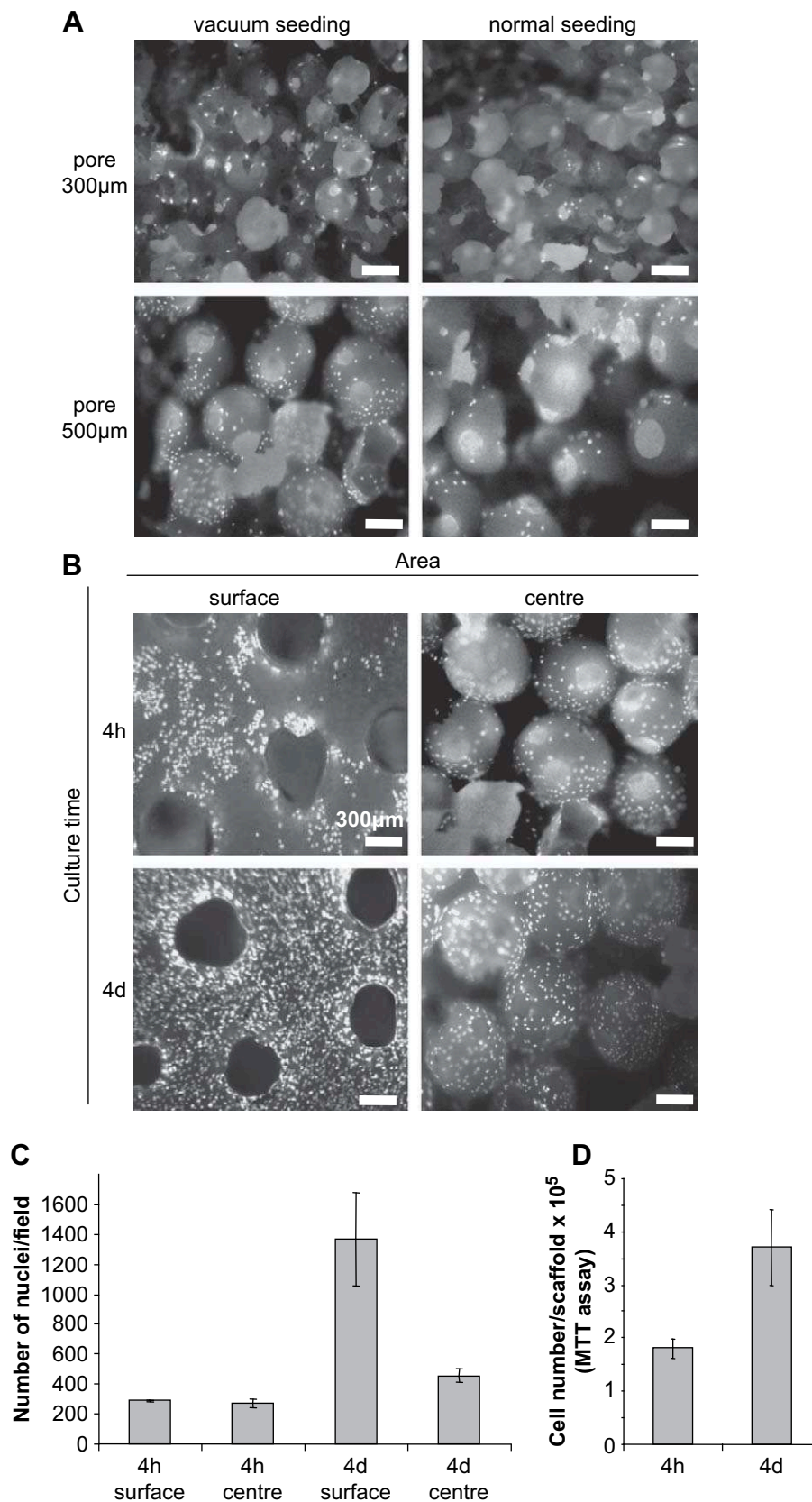


Fig. 4. Cell density in seeded scaffolds. (A) Comparison of seeding procedures in 300 µm and 500 µm scaffolds. Nuclei were DAPI-stained 4 h post-seeding. Observations were performed at the centre of the scaffolds. (B) Vacuum seeding of 500 µm scaffolds. Nuclei were DAPI stained. Observations were done at the surface and centre of the scaffolds, 4 h and 4 days after seeding. (C) Quantification of DAPI-stained nuclei, at the surface and centre of 500 µm scaffolds, 4 h and 4 days after seeding. (D) Cell viability in 500 µm scaffold, evaluated by MTT assay, 4 h and 4 days after seeding. Bars = 300 µm.

deposition of the cell suspension at the top of the scaffold. Biomaterials with inferior pore size (300 μm) did not allow cell penetration when cell suspension was directly deposited on the scaffold; and vacuum seeding did not really improve the colonization, as only few cells were detected in the pores (Fig. 4A). For this reason, scaffolds with 500 μm pore size were chosen for the following experiments. After 4 days of culture, DAPI staining showed that cell growth was effective in both the external surface and the centre of the 500 μm scaffold (Fig. 4B). Cellularization was identical at the surface and at the centre at seeding, and increased by 1.5-folds at the centre and 4.5-folds after 4 days (Fig. 4C).

Live cell numbers in the whole scaffolds were measured at different culture times with the MTT assay. In the initial stage of cell adhesion, i.e. after 4 h, 180 000 viable cells were adherent in each scaffold, the small standard deviation showing good seeding reproducibility. A 2-fold increase in cell numbers was observed after 4 days (Fig. 4D).

3.3. Effects of mechanical compression signals on extracellular matrix

The expression of collagen mRNA was quantified 14 h after a single 15 min strain episode to select the most efficient regimen.

The 3 Hz sinusoidal wave alone (S_3) up-regulated significantly collagen mRNA 1.3-fold. This sine combined with 100 Hz or 50 Hz vibrations down-regulated significantly collagen mRNA. In contrast, a 3 Hz sine combined with 25 Hz vibration (S_3V_{25}) up-regulated significantly collagen mRNA by about 2-fold, higher than 3 Hz sine alone (Fig. 5A). A kinetic study with S_3V_{25} signal showed a significant increase of collagen mRNA starting 12 h after mechanical strain (Fig. 5B). Collagen production was measured in the culture medium collected 16 h and 48 h after mechanical compression. A S_3V_{25} regimen increased (2-fold) C1CP amounts secreted in the culture medium between 16 h and 48 h post-strain (Fig. 5C). Cell proliferation as controlled by DNA and protein assay, was not altered by the compression (data not shown).

Similar to collagen, the 3 Hz sinusoidal wave alone up-regulated significantly fibronectin mRNA 1.2-fold (Fig. 6A). The S_3V_{50} signal as well as S_3V_{100} signal down-regulated significant fibronectin mRNA, whereas the S_3V_{25} regimen up-regulated significant fibronectin mRNA by 1.6-fold vs control. Again, this combined signal was more efficient than sine alone, with a 1.3-fold increase vs S_3 (Fig. 6A). A kinetic study with S_3V_{25} signal showed a significant increase of fibronectin mRNA level starting 8 h post-strain, sustained until at least 14 h post-strain (Fig. 6B). The fibronectin network was visualised by immunofluorescence staining of the scaffold and

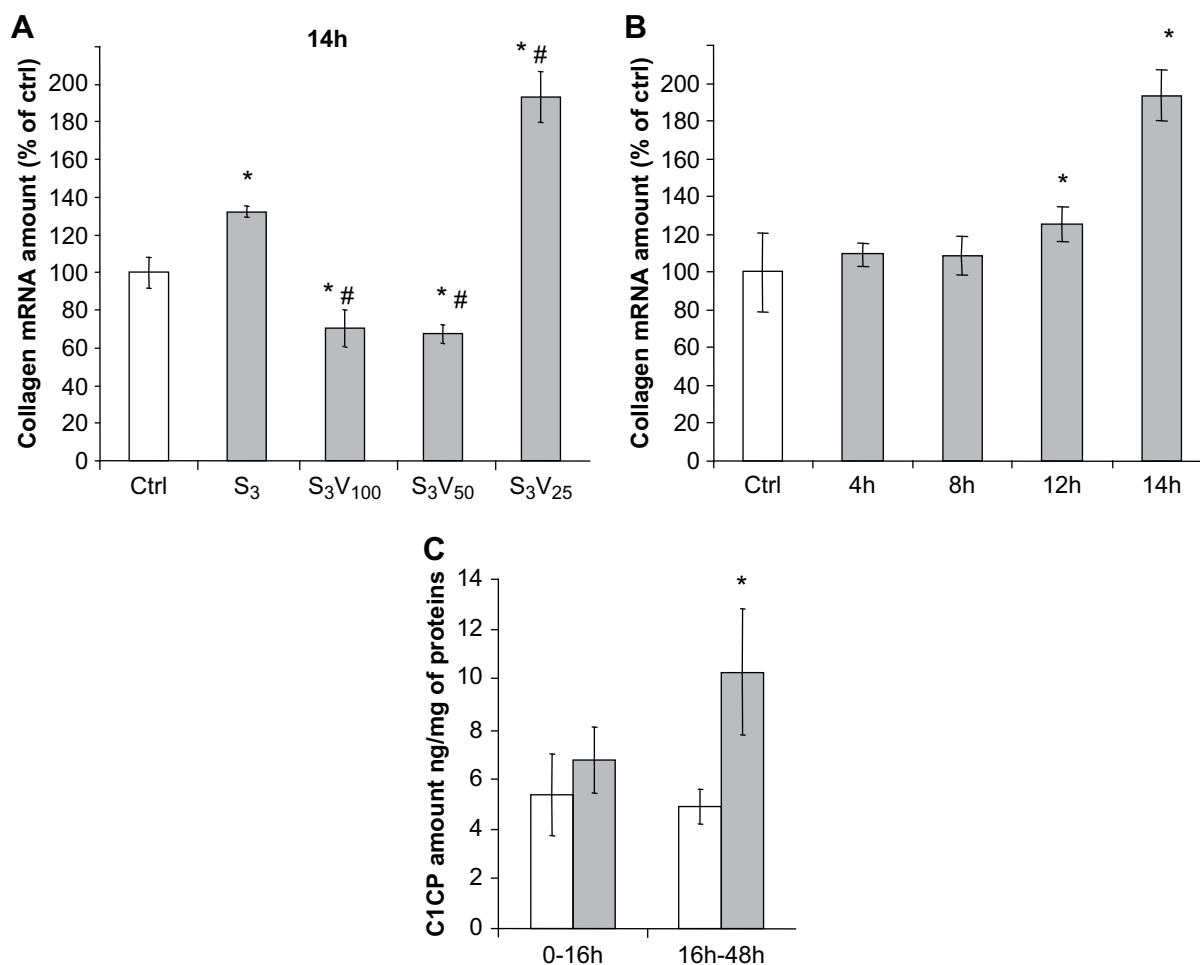


Fig. 5. Effects of mechanical compression signals on collagen expression and production. (A) Collagen mRNA levels in MG-63 cells cultured in 3D scaffolds, measured 14 h after different mechanical strains. (B) Collagen mRNA levels were quantified 4, 8, 12 and 14 h (h) after strain under the S_3V_{25} regimen. Values were normalized to cyclophilin mRNA level and expressed as a ratio to controls. (C) Collagen production assay: the amount of C1CP secreted was measured in culture medium collected 16 h after S_3V_{25} strain, then again 32 h later (48 h post-strain) after a medium change. Results (ng) are normalized to total cellular protein content (mg) in the cell lysate. Unstrained (empty bars) and strained (grey bars) 3D cultures were grown in parallel. * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs S_3 .

confocal microscopy was performed to provide information about fibronectin organisation (Fig. 6C). Quantification showed that the thickness of fibronectin fibres increased in strained cultures compared with controls (Fig. 6D).

3.4. Effects of mechanical compression on VEGF expression and distribution

VEGF-A was analysed with the regimen the most efficient in terms of matrix production. A kinetic study with the S_3V_{25} regimen

showed a significant increase of VEGF189 mRNA between 4 h and 12 h after mechanical stimulation (Fig. 7A), returning to the basal level by 14 h. No detectable changes were observed for other VEGF mRNA (121 and 165) 8 h after strain (Fig. 7B). VEGF protein amounts were measured 12 h and 48 h after mechanical compression. No change could be detected after 12 h, neither in the culture medium nor in the scaffolds. An increase of VEGF protein amounts was observed 48 h post S_3V_{25} strain in the scaffold. Soluble VEGF, measured in the culture medium, increased with time in static conditions, but not under compression, leading to

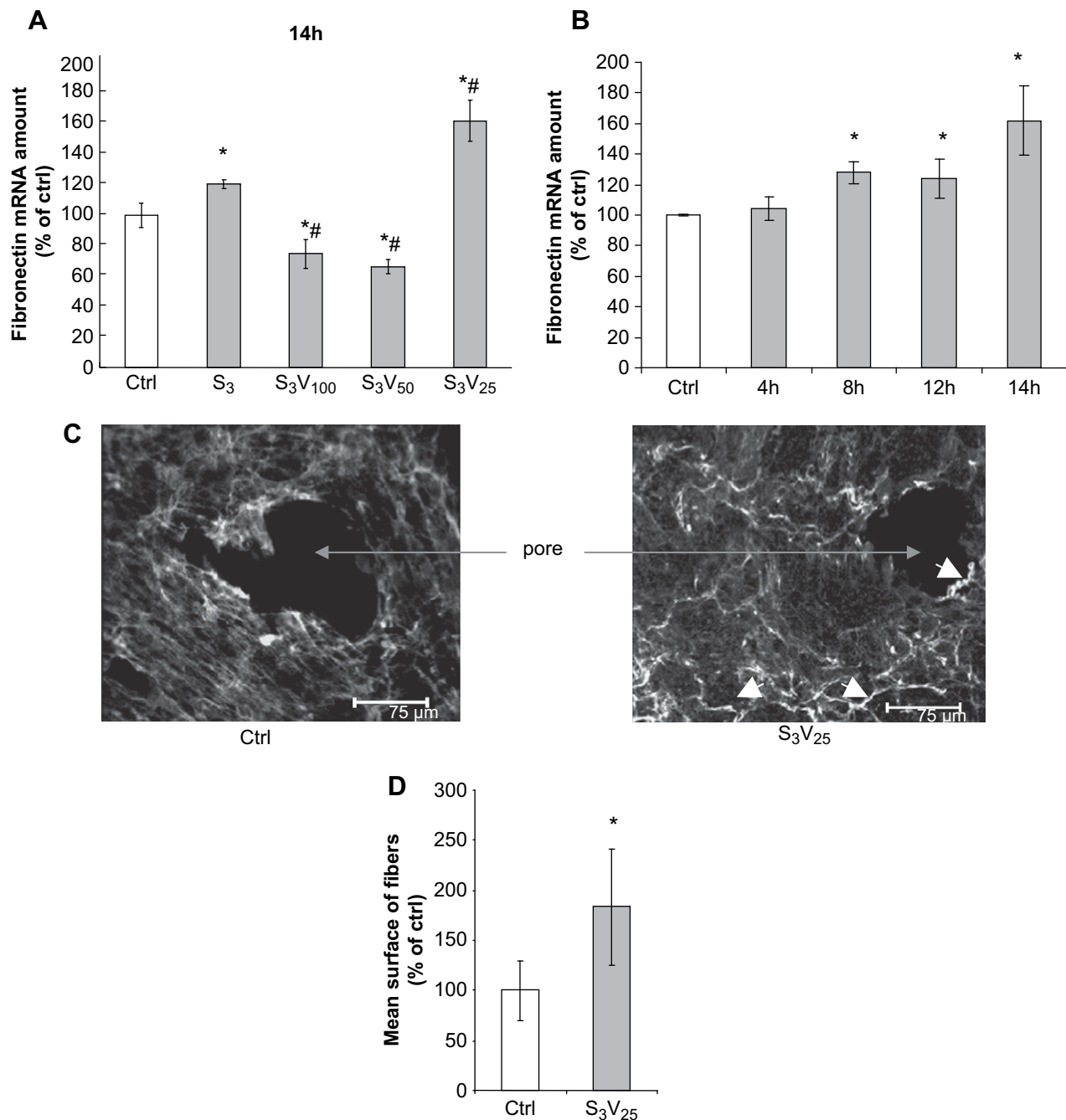


Fig. 6. Effects of mechanical compression signals on fibronectin expression and network organisation. (A) Fibronectin mRNA levels in MG-63 cells cultured in 3D scaffolds, measured 14 h after different mechanical strains (B) Fibronectin levels were quantified 4, 8, 12 and 14 h after strain under the S_3V_{25} regimen. Values were normalized to cyclophilin mRNA level and expressed as a ratio to controls. (C) Confocal imaging of immunolabeled fibronectin network nearby a pore on the surface of cultured scaffolds in a control (Ctrl) and a strained scaffold 24 h after S_3V_{25} strain. White arrows show thicker fibres in strain scaffold. (D) Quantification of the mean area of fibronectin fibres in control and strained scaffolds. * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs S_3 .

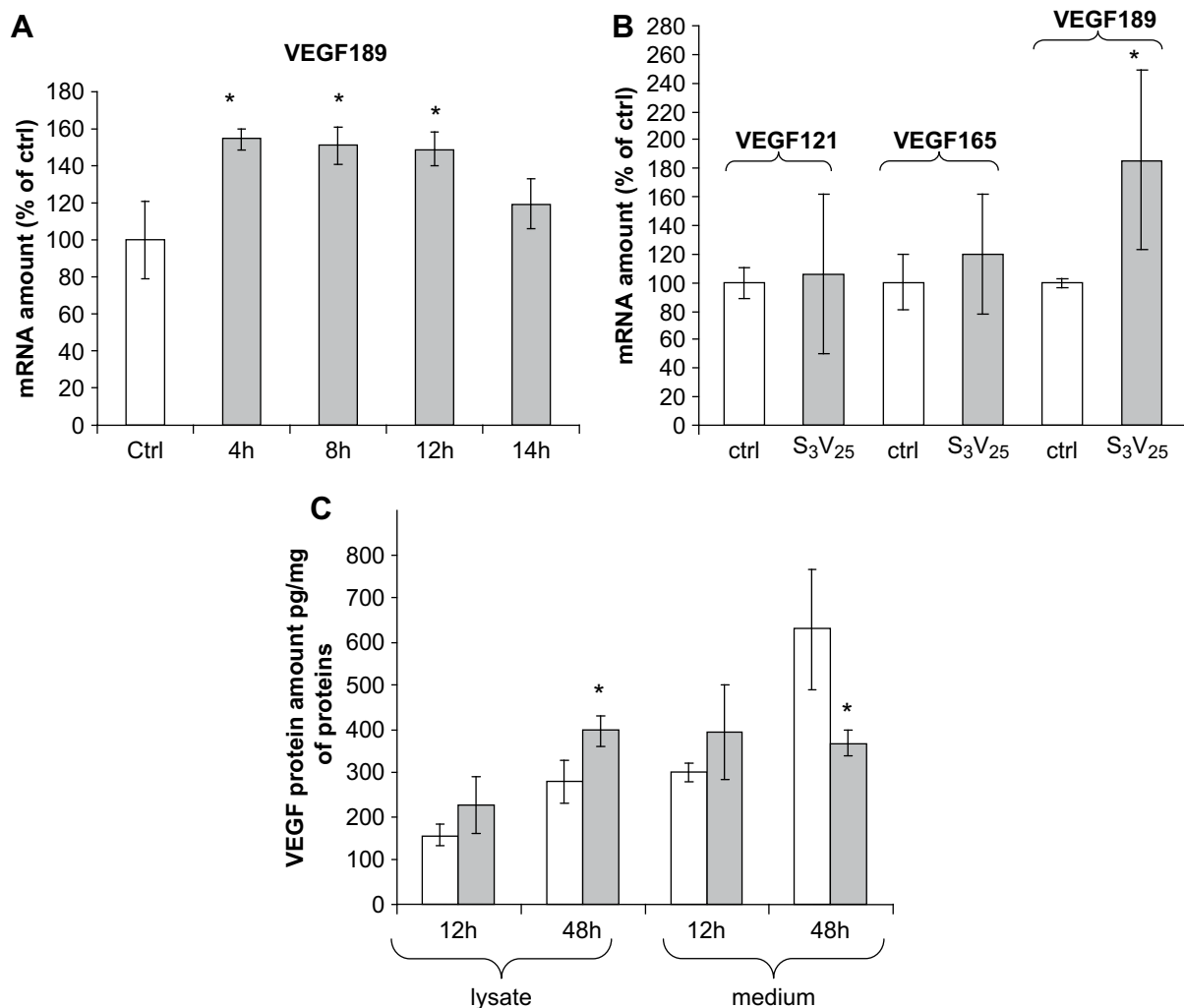


Fig. 7. Effects of mechanical compression on VEGF expression and distribution. (A) Levels of VEGF189 mRNA expression were quantified 4, 8, 12 and 14 h (h) after S₃V₂₅ strain. (B) VEGF121, 165 and 189 mRNA levels in MG-63 cells cultured in 3D scaffolds, measured 8 h after S₃V₂₅ strain. Values were normalized to cyclophilin mRNA level and expressed as a ratio to controls (Ctrl). (C) VEGF amounts were measured in scaffold lysate and in culture medium 12 and 48 h after S₃V₂₅ strain. Results (pg) are normalized to total cellular protein content (mg) in the lysate. Unstrained (empty bars) and strained (grey bars) 3D cultures were grown in parallel. **p* < 0.05 vs control.

2-fold lower values than static control 48 h after compression (Fig. 7C). We checked that proliferation was not modified by 12 h and 48 h post-compression (not shown).

4. Discussion

The first desirable features for scaffold seeding include preservation of cell viability, uniformity in cell distribution and reproducibility [20]. The majority of tissue engineering studies involves surface seeding [21]; bulk seeding is harder to accomplish and usually requires an active method of deployment [22]. The vacuum seeding technique used in this study allowed us to overcome these difficulties. The system efficiently removed air bubbles from the scaffold, favoured cell colonization with as many cells counted inside as outside the scaffold. Moreover this technique allowed seeding of all the scaffolds with the same cell suspension in one time, ensuring a better reproducibility. The cells were able to populate and proliferate in both the periphery and the centre of scaffolds over a 4-day period.

The geometry of three-dimensional scaffolds is essential for creating realistic tissues and organs for regenerative medicine. Interconnected macroporosity is required for full colonization of

scaffolds, high porosity resulting in greater bone ingrowth. Specifically, pore sizes ~500 μ m are recommended [23], although such features result in low mechanical properties [24]. Scaffolds with 500 μ m pore size appeared to be resistant enough to slight compressions as those used in this study. Also, this pore size may be sufficient to enable capillary formation after implantation, which is needed to transport nutrients and metabolic waste products through the scaffolds [25].

Our aim was to define strain regimens beneficial, in short term culture, for matrix production and/or organisation, with the idea that this matrix could act as a provider of growth factors. Many parameters of mechanical stimulation have been described for their osteogenic potential including frequency, magnitude, duration, and number of cycles [26–29]. Fritton et al. [30] described that during normal activities such as locomotion which is known to be osteogenic, bone is naturally subjected to compression with high amplitude/low frequency strain, and low-amplitude/high-frequency strain. In vivo experiments using strain gauges in different species including humans have shown that the magnitudes of deformations produced on the external interface of the femur (tension) vary from 100 to 3000 microstrains (μ ε) [30,31]. Over the course of a day, weight bearing bones experience large strains over 1000 μ ε only

a few times, while small strains of less than 10 $\mu\epsilon$ occur thousands of times. Nevertheless, very few *in vitro* studies used combined signal strategy as a potential osteogenic signal. In a model of collagen gel populated by osteoblasts, Tanaka et al. [32] demonstrated that a low frequency sinusoid alone or a high frequency signal (vibration) alone had no effect on osteocalcin mRNA, but that a broad frequency strain could sensitize osteoblasts to high amplitude, low frequency strain. While these experiments were carried out with noises containing all the spectrum of frequencies, we chose to superimpose vibrations with defined frequencies (25 Hz, 50 Hz, 100 Hz) to a carrier 3 Hz signal. The signal amplitudes used in this study were chosen to be as low as possible, in order not to be deleterious to the biomaterial. We showed that in our 3D construct, osteoblastic cells were responsive to a short episode of compressive loading. Collagen and fibronectin, the most representative proteins of the extracellular matrix, were slightly up-regulated after 15 min of S3 loading, and adding 25 Hz vibration to a 3 Hz sinusoidal wave improved the mechanical sensitivity of osteoblasts. Our results are in line with those of Tanaka and coworkers [31,32] suggesting a contribution of stochastic resonance in the osteogenic response. However, higher frequency vibrations (50 Hz, 100 Hz) added to 3 Hz compression inhibited matrix protein expression. Thus, superimposition of vibrations on a carrier signal to favour osteoblast sensitivity is limited to a window of frequencies within a relatively low range, up to 25 Hz in our experimental model. Therefore, a compressive strain pattern acts on bone cells in a frequency dependent manner.

Vascularization of new bioengineered tissue is critical for osteointegration and VEGF is determinant at this step. To improve the angiogenic potential of the 3D tissue constructs, several approaches have been proposed. VEGF releasing scaffolds have the ability to enhance neovascularization and bone regeneration once implanted [33,34]. These factors diffuse into the local environment, where they induce existing blood vessels to grow into the scaffold, ultimately forming continuous vessels [35,36]. However, due to the short half-life of these factors and their rapid diffusion out of target tissues, frequent and high dose administrations are required to achieve a significant response. Moreover, high levels of growth factors can lead to uncontrolled side effects locally and at distant sites, including hyperpermeable vessels, stimulation of tumor growth, abnormal vascular function, and hypervascularity. Recent studies proposed another approach consisting of co-cultures of bone marrow stem cells and endothelial cells [37]. Endothelial cells can enhance vascularization in engineered-bone tissue by the direct contact or interaction with bone cells [38]. This complex but interesting coculture model could benefit from mechanical strategies because VEGF is an important mediator of osteoblast–endothelial cells crosstalk. Because VEGF exists under soluble and matrix linked forms, we quantified separately the different variants at the mRNA and protein level. The alternative splicing of VEGF mRNA renders 3 major isoforms of 121, 165 and 189 amino acids respectively, in humans [39]. VEGF121 is a purely soluble isoform. VEGF189 is stably incorporated into the ECM, whereas VEGF165 is less strongly bound to the matrix and exists in equilibrium with a soluble form. We showed that only the VEGF189 isoform increased under mechanical stimulation with the S₃V₂₅ regimen. Previous studies in our laboratory have shown, in a model of 2D substrate stretching, that mRNA expression of soluble VEGF isoforms by human osteoblast cultures was up-regulated under a low frequency signal (0.05 Hz), while matrix-bound VEGF isoforms were up-regulated under a high frequency signal (5 Hz) in [15]. Our observations were completed at the protein level, where the insoluble VEGF trapped in the scaffold increased whereas the soluble form decreased under strain. The observed decrease of soluble VEGF in the medium of compressed scaffolds was not

correlated at the mRNA level with a decrease of the 121 or 165 isoform. This may reflect a difference in time course, as mRNA was measured after 8 h and proteins after 12 and 48 h. Also, VEGF expression could be regulated at the traduction level, or its binding to the matrix could be increased (see below). (Repris de la remarque du reviewer2) To go further, the challenge will be to find methods to separate VEGF from matrix and cells and measure it separately to show whether mechanical signals upregulate synthesis of VEGF or its sequestration in the matrix.

Although VEGF 189 binds with high affinity to heparan sulphate proteoglycan [40], a VEGF binding domain has been identified recently in fibronectin [41]. VEGF must be sequestered in an adequate matrix, and both fibronectin amounts and network organisation could be a determinant for improving its quality. In the present study, we showed a strain-induced fibronectin network reorganisation which could promote growth factor storage. The new arrangement of the matrix could act for example by making available cryptic sites, thus increasing the binding potential of the matrix, and orienting for instance VEGF165 distribution towards matrix-binding. If the VEGF 165 is a significant contributor to the soluble VEGF fraction, the increase and remodelling of ECM induced by mechanical stimulation could explain that a reduction of soluble VEGF protein would be observed after strain independent of transcriptional changes. Along with VEGF and its angiogenic and osteogenic potential, other growth factors can cooperate with ECM to influence cellular behaviour, and their expression and distribution will have to be explored in this context [42,43].

5. Conclusion

Our study identified a specific combination of compression strain regimens which proved able, after short term application, to increase the production of major matrix components of the bone tissue, including a matrix-targeted variant of a major vascularization factor, VEGF. This study thus showed that functionalization of bone substitutes by high frequency, low amplitude mechanical strain is a promising strategy for an optimising implantation and controlling angiogenesis.

Acknowledgements

The authors wish to thank Sabine Palle for confocal microscopy technical assistance, Sylvie Peyroche and Celine Faure for expert technical assistance in cell culture and RT-PCR. This study was supported by the European Space Agency, European Research In Space and Terrestrial Osteoporosis (ERISTO) contract number 14232/NL/SH (CCN3) and Microgravity Application Programme AO-99-122 contract number 14426, by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Virginie Dumas held a research fellowship from La Region Rhone Alpes.

References

- [1] Qi X, Liu JG, Chang Y, Xu XX. Comparative study on seeding methods of human bone marrow stromal cells in bone tissue engineering. *Chin Med J (Engl)* 2004;117(4):576–80.
- [2] Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine* 2006;1(3):317–32.
- [3] Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs* 2005;8(3):131–6.
- [4] Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech* 2003;60(1):107–14.
- [5] Amoroso A, Del Porto F, Di Monaco C, Manfredini P, Afeltra A. Vascular endothelial growth factor: a key mediator of neoangiogenesis. A review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 1997;1(1–3):17–25.
- [6] Ko HC, Milthorpe BK, McFarland CD. Engineering thick tissues – the vascularisation problem. *Eur Cell Mater* 2007;14:1–18, discussion 18–9.

- [7] Shen YH, Shoichet MS, Radisic M. Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomater* 2008;4(3):477–89.
- [8] Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 2007;117(6):1616–26.
- [9] Rubin C, Turner AS, Bain S, Mallinckrodt C, McLeod K. Anabolism: low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* 2001;412(6847):603–4.
- [10] Rubin C, Turner AS, Muller R, Mittra E, McLeod K, Lin W, et al. Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. *J Bone Miner Res* 2002;17(2):349–57.
- [11] Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S. Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone* 2002;30(3):445–52.
- [12] Judex S, Boyd S, Qin YX, Turner S, Ye K, Muller R, et al. Adaptations of trabecular bone to low magnitude vibrations result in more uniform stress and strain under load. *Ann Biomed Eng* 2003;31(1):12–20.
- [13] Thi MM, Iacobas DA, Iacobas S, Spray DC. Fluid shear stress upregulates vascular endothelial growth factor gene expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1117:73–81.
- [14] Bhatt KA, Chang EI, Warren SM, Lin SE, Bastidas N, Ghali S, et al. Uniaxial mechanical strain: an in vitro correlate to distraction osteogenesis. *J Surg Res* 2007;143(2):329–36.
- [15] Faure C, Linossier MT, Malaval L, Lafage-Proust MH, Peyroche S, Vico L, et al. Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone* 2008;42(6):1092–101.
- [16] Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *J Biomech* 2008;41(5):1095–103.
- [17] Clover J, Gowen M. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* 1994;15(6):585–91.
- [18] Jones DB, Broeckmann E, Pohl T, Smith EL. Development of a mechanical testing and loading system for trabecular bone studies for long term culture. *Eur Cell Mater* 2003;5:48–59. discussion 59–60.
- [19] David V, Guignandon A, Martin A, Malaval L, Lafage-Proust MH, Rattner A, et al. Ex vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain. *Tissue Eng Part A* 2008;14(1):117–26.
- [20] Soletti L, Nieponice A, Guan J, Stankus JJ, Wagner WR, Vorp DA. A seeding device for tissue engineered tubular structures. *Biomaterials* 2006;27(28):4863–70.
- [21] Van Wachem PB, Stronck JW, Koers-Zuideveld R, Dijk F, Wildevuur CR. Vacuum cell seeding: a new method for the fast application of an evenly distributed cell layer on porous vascular grafts. *Biomaterials* 1990;11(8):602–6.
- [22] Nieponice A, Soletti L, Guan J, Deasy BM, Huard J, Wagner WR, et al. Development of a tissue-engineered vascular graft combining a biodegradable scaffold, muscle-derived stem cells and a rotational vacuum seeding technique. *Biomaterials* 2008;29(7):825–33.
- [23] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26(27):5474–91.
- [24] Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27(18):3413–31.
- [25] Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997;121(2):317–24.
- [26] Hsieh YF, Turner CH. Effects of loading frequency on mechanically induced bone formation. *J Bone Miner Res* 2001;16(5):918–24.
- [27] Scott A, Khan KM, Duronio V, Hart DA. Mechanotransduction in human bone: in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. *Sports Med* 2008;38(2):139–60.
- [28] Tang L, Lin Z, Li YM. Effects of different magnitudes of mechanical strain on osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344(1):122–8.
- [29] Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Beck A, Claes L, Ignatius A. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. *J Biomech* 2002;35(7):873–80.
- [30] Fritton SP, McLeod KJ, Rubin CT. Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains. *J Biomech* 2000;33(3):317–25.
- [31] Turner CH, Yoshikawa T, Forwood MR, Sun TC, Burr DB. High frequency components of bone strain in dogs measured during various activities. *J Biomech* 1995;28(1):39–44.
- [32] Tanaka SM, Li J, Duncan RL, Yokota H, Burr DB, Turner CH. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J Biomech* 2003;36(1):73–80.
- [33] Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27(17):3249–55.
- [34] Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res* 2006;21(5):735–44.
- [35] Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials* 2005;26(14):1857–75.
- [36] Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release* 2000;64(1–3):91–102.
- [37] Sun H, Qu Z, Guo Y, Zang G, Yang B. In vitro and in vivo effects of rat kidney vascular endothelial cells on osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells growing on polylactide-glycolic acid (PLGA) scaffolds. *Biomed Eng Online* 2007;6:41.
- [38] Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliarese C, Kunkel M, et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 2007;28(27):3965–76.
- [39] Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5(12):1806–14.
- [40] Stringer SE. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 3):451–3.
- [41] Wijelath ES, Murray J, Rahman S, Patel Y, Ishida A, Strand K, et al. Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity. *Circ Res* 2002;91(1):25–31.
- [42] Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 2003;316:23–32.
- [43] Tokuda H, Hirade K, Wang X, Oiso Y, Kozawa O. Involvement of SAPK/JNK in basic fibroblast growth factor-induced vascular endothelial growth factor release in osteoblasts. *J Endocrinol* 2003;177(1):101–7.

➤ Perspectives et conclusion de la première partie

Nous disposons ainsi d'un modèle 3D faisant l'interface entre la culture classique et l'expérimentation animale. Les études présentées ici sont réalisées sur un court terme. Ce modèle doit encore évoluer afin de pouvoir cultiver les cellules sur le long terme. Un système de perfusion couplé à l'application de contraintes mécaniques devrait permettre de se rapprocher de l'environnement biomécanique du tissu osseux. Dans cette perspective, une chambre de culture adaptée au système de contrainte ZetOS et capable de perfuser correctement des céramiques macroporeuses cellularisées vient d'être développée et est en cours de validation au laboratoire. Ce nouveau projet consiste à mettre au point un modèle multicellulaire 3D (ostéoblastes, ostéoclastes et cellules endothéliales) perfusé et soumis à des contraintes mécaniques recréant ainsi le remodelage osseux *in vitro* dans un substitut macroporeux. D'autre part, parce que la combinaison des stimulations semble être une bonne approche pour stimuler l'ostéogénèse, il serait intéressant dans ce modèle 3D de coupler les sollicitations mécaniques avec d'autres agents (pharmacologiques...) afin de potentialiser les réponses ostéogéniques.

Les biomatériaux commercialisés, déjà utilisés pour des implantations, présentent de faibles propriétés mécaniques. Le signal complexe que nous venons de définir est donc adaptable à la plupart de ces matériaux macroporeux. Cependant, lors d'un travail préliminaire, nous avons constaté que des céramiques (Millenium) de porosité voisine de celle que nous avons utilisée dans ce travail (Biocetis) n'avaient pas la résistance mécanique suffisante pour être sollicitées mécaniquement dans le dispositif ZetOS. Elles présentaient pourtant de nombreux autres avantages : meilleure interconnexion entre les pores, structure globale similaire aux travées osseuses, plus faciles à ensemercer et une meilleure pénétration du milieu de culture au centre du biomatériau. Il faut donc envisager d'autres modalités de stimulations pour fonctionnaliser ces matériaux.

Les résultats présentés dans la première partie de cette thèse ayant démontré l'intérêt de la combinaison de plusieurs signaux ainsi que le potentiel ostéogénique des signaux BAHF, nous avons pensé que l'utilisation de signaux d'amplitude encore plus faible combinés à des stimulations telles que les champs électriques pourrait être une solution pour les matériaux présentant une faible résistance mécanique. Avant de pouvoir appliquer de tels signaux à des structures 3D, il était nécessaire d'analyser leurs effets sur un modèle de culture 2D.

V.2. DEUXIEME PARTIE : Réponses cellulaires à la combinaison d'une stimulation mécanique « basse amplitude-haute fréquence » et d'un champ électrique

In vivo, lorsque l'os est soumis à des contraintes mécaniques, il se crée des champs électriques dus aux effets piézoélectriques ou aux potentiels de flux. *In vitro*, les champs électriques appliqués à des cultures ostéoblastiques peuvent augmenter certains facteurs de croissance tels que le TGF β 1 (ARNm) (Zhuang, Wang et al. 1997) ou le VEGF (ARNm et protéine) (Zhao, Bai et al. 2004; Kim, Song et al. 2006). Dans ce contexte, notre hypothèse est que le champ électrique serait capable de compléter les effets ostéogéniques des BAHF en agissant notamment sur les facteurs angiogéniques. Avant de combiner les deux types de stimulations mécaniques et électriques, nous avons développé un protocole expérimental pour chaque type de stimuli.

Nous présentons tout d'abord les réponses cellulaires aux très BAHF sous la forme d'un 2^{ème} article et de résultats complémentaires.

Ensuite nous parlons des champs électriques appliqués à des cultures cellulaires, pour cela nous avons mis en place des expérimentations destinées à:

- développer et caractériser plusieurs dispositifs pour générer un champ électrique
- tester plusieurs modalités de champ électrique (forme, fréquence, amplitude, durée)
- analyser les effets sur plusieurs types cellulaires : lignées ostéoblastiques (MC3T3-E1), cellules primaires ostéoblastiques et cellules stromales (C3H10T1/2)

Cette étape a permis de sélectionner le type de champ électrique à appliquer en combinaison avec les BAHF.

Dans la dernière partie, nous avons proposé une étude préliminaire montrant les effets de la double stimulation (champ électrique + BAHF) sur l'expression et la synthèse des facteurs angiogéniques. Les variations d'expression de facteurs impliqués dans l'angiogénèse ont été évaluées grâce à une analyse par microarray.

V.2.1 Article 2 : Réponses cellulaires à la stimulation mécanique « basse amplitude-haute fréquence »

Extracellular matrix produced by osteoblasts cultured under “low magnitude high frequency” stimulation is favourable to osteogenic differentiation of CSMs.

Dumas V. et coll.

Soumis à Calcified Tissue International

►Résumé de l'article 2

Lors de la locomotion, des mesures ont montré que le tissu osseux est naturellement soumis à de fortes amplitudes de déformations ($>1000\mu\epsilon$) quelque fois par jour alors que de faibles déformations (10 à $100\mu\epsilon$) se produisent beaucoup plus fréquemment, jusqu'à des milliers de fois par jour. L'ostéoblaste s'adapte à la contrainte mécanique par une activité cellulaire dépendante du signal appliqué. Les effets des signaux « basse amplitude-haute fréquence » ont été très peu étudiés. Nous avons développé un système capable de délivrer de très faibles déformations ($15-40\mu\epsilon$, amplitude contrôlée par des jauges de déformation) à haute fréquence (400 Hz) sur des cultures 2D. Nous avons étudié les effets de ces BAHF sur la synthèse de matrice extracellulaire produite par des ostéoblastes. Les propriétés fonctionnelles de la MEC ont été évaluées sur des cellules souches mésenchymateuses (CSMs).

Les BAHF ont été appliquées 20 minutes par jour pendant 1, 3 ou 7 jours sur des ostéoblastes (MC3T3-E1) en culture conventionnelle (1dBAHF, 3dBAHF or 7dBAHF). Le nombre de cellules et la viabilité ne sont pas affectés après 3 ou 7 dBAHF. Les contacts focaux et le cytosquelette se réorganisent ; la production d'oxyde nitrique est augmentée, ce qui démontre que les cellules sont sensibles aux BAHF.

Concernant les effets sur la MEC, les expressions des ARNm de la fibronectine (Fn), de l'ostéopontine (OPN) et de la sialoprotéine (BSP) sont augmentées par rapport aux cultures contrôles après 1dBAHF (respectivement 1.8, 1.6 et 1.5 fois). L'augmentation de l'expression de la Fn est maintenue jusqu'à 7 jours et celle du collagène de type I est uniquement augmentée (1,7 fois) à 7 jours. De plus, au niveau protéique, on note une augmentation de l'OPN après 3BAHF et une réorganisation de la MEC comme le montre l'analyse de la topologie du réseau de Fn après 7BAHF.

Les MEC 7dBAHF et les MEC contrôles ont ensuite été décellularisées pour être ensemencées avec des CSM. Les MEC 7dBAHF. Elles ont été testées pour leur capacité à moduler les interactions matrice-CSM et la différenciation ostéogénique. Sur les MEC 7dBAHF, nous montrons une amélioration de l'attachement cellulaire précoce, suivi d'une augmentation du nombre de contacts focaux (+60% de vinculine) par cellule. A court terme, l'analyse d'image révèle également des changements morphologiques chez les CSMs. A plus long terme, après 5 jours de culture en milieu permissif permettant la différenciation ostéogénique ou adipocytaire, nous montrons que les MEC 7dBAHF facilitent l'engagement des CSMs vers la voie ostéoblastique aux dépens de la voie adipocytaire. En effet les

expressions des ARNm de la PAL, du collagène de type I et de la fibronectine sont augmentés respectivement de 1.9, 1.4 et 2.2 fois alors que l'ARNm de PPAR γ 2 et son expression protéique sont diminués de 2 fois.

Ces résultats démontrent que les BAHF sont capables de fonctionnaliser une MEC. Ces signaux mécaniques de très faible amplitude sont donc efficaces pour générer une matrice améliorant l'attachement des CSMs ainsi que leur différenciation ostéogénique. Il paraît donc intéressant de développer ce concept en ingénierie tissulaire, la MEC étant une interface essentielle pour l'ostéointégration des biomatériaux.

Extracellular matrix produced by osteoblasts cultured under low magnitude high frequency stimulations is favourable to osteogenic differentiation of MSCs.

Virginie Dumas^{ab}, Benjamin Ducharne^c, Anthony Perrier^{ab}, Carole Fournier^{ab}, Alain Guignandon^{ab}, Mireille Thomas^{ab}, Sylvie Peyroche^{ab}, Daniel Guyomar^c, Laurence Vico^{ab}, Aline Rattner^{ab*}.

^aUniversité de Lyon F42023 Saint-Etienne France.

^bINSERM U890, Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux, IFR143, F42023 Saint-Etienne France.

^cLaboratoire de Génie Electrique et Ferroélectricité, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon, France.

*Corresponding author. Aline.Rattner@univ-st-etienne.fr, Tel.: +33 4 77 42 14 42; fax: +33 4 77 57 55 72.

Key Words: osteoblasts, mechanical loading, matrix proteins, mesenchymal stem cells, biomaterials

Running title: LMHF stimulations on osteoblasts enhance osteogenic properties of ECM

Abstract

The effects of low magnitude/high frequency (LMHF) mechanical stimulation on osteoblastic cells are poorly understood. We have developed a system generating very small (15-40µε) high frequency (400Hz, sine) deformations on osteoblast cultures (MC3T3-E1). We investigated the effects of these LMHF stimulations mainly on extracellular matrix (ECM) synthesis. The functional properties of this ECM after decellularisation were evaluated on C3H10T1/2 mesenchymal stem cells (MSCs).

LMHF stimulations were applied 20 minutes once daily for 1, 3 or 7 days on MC3T3-E1 culture (1dLMHF, 3dLMHF or 7dLMHF). Cell number and viability were not affected after 3 or 7 dLMHF. Osteoblast response to LMHF was assessed by an increase in nitric oxide secretion, alteration of the cytoskeleton and focal contacts. mRNA expressions for fibronectin, osteopontin, bone sialoprotein and type I collagen in LMHF cultures were 1.8-, 1.6-, 1.5- and 1.7-fold higher than controls, respectively. In terms of protein, osteopontin levels were increased after 3dLMHF and ECM organisation was altered as shown by fibronectin topology after 7dLMHF. After decellularisation, 7dLMHF-ECM or control ECM were reseeded with mesenchymal stem cells (MSCs). 7dLMHF-ECM improved early events such as cell attachment (2h) and focal contact adhesion (6h) and, at later time (16h), modified MSCs morphological parameters. After 5 days in multipotential medium, gene expression changes indicated that 7dLMHF-ECM promoted the expression of osteoblast markers at the expense of adipogenic marker. LMHF stimulations of osteoblasts are therefore efficient and sufficient to generate osteogenic matrix.

Introduction

Cyclic mechanical loading is able to increase bone formation by stimulating osteogenesis [1]. Several mechanical parameters, such as strain rate, number of cycles or resting periods, have been shown to influence bone cell response to loading [2]. Strain rate can be further subdivided into strain magnitude and loading frequency. Fritton et al [3] showed that, during normal activities, low magnitude ($<100\mu\epsilon$) bone deformations occur more often than higher strains ($>1000\mu\epsilon$), suggesting that low-magnitude mechanical stimuli could be used to promote adaptive bone formation. Recent *in vivo* studies have focused on low-magnitude mechanical signals because of their safety profile. Some teams [4] [5] working on animals have demonstrated the osteogenic effects of short-duration low-magnitude mechanical stimuli applied at high frequencies. The loss of strain amplitude appears to be compensated by application of higher frequency loading [6]. The results of recent clinical studies have shown the value of these mechanical regimens for frail patients unable to perform regular physical exercise [7, 8]. However, exploration of low-magnitude high-frequency (LMHF) mechanical signals proved to be more difficult than expected. Although a few teams have regularly published positive results, other recent studies have not always demonstrated benefits on all bone sites [9]. Moreover, conditions vary so widely between studies (frequency ranges, acceleration, and exposure time) that it is difficult to derive a general and consistent pattern. *In vitro* data are missing, which could highlight the role of LMHF loading on matrix synthesis. These studies have only focused on changes of secondary messengers [10, 11].

ECM plays an important role in maintaining and mediating bone function. It is also a source of factors supporting bone cell differentiation, as several studies suggest that the 3D matrix structure and organisation can influence the phenotypic behaviour of cells [12],[13],[14]. ECM is therefore considered to be an essential interface to functionalise cellularised bone substitute providing osteoinductive properties. From this perspective, it appeared of interest to examine the osteogenic potential of very LMHF mechanical stimulation on cellular response in terms of quantitative and qualitative modifications of the extracellular matrix (ECM).

To explore the osteoblast response to mechanical signals, the first part of the present investigation consisted of developing an original device able to generate controlled very low magnitude high frequency stimulations (LMHF) on cell cultures. This study investigates whether osteoblasts would consistently respond to the applied strain, and was designed to determine to what extent extracellular matrix production and organisation can be modified by these LMHF stimulations. Osteoblast responsiveness (MC3T3-E1) to LMHF was tested by examining typical mechanotransducers (nitric oxide, cytoskeleton and focal contacts). Extracellular matrix was also analysed at the mRNA and protein levels and image analysis was performed to examine ECM organisation.

The final objective of this study was to assess the properties of the ECM produced by these LMHF osteoblasts (MC3T3-E1). For this purpose, decellularised matrices were used as substrate for mesenchymal stem cells (MSCs) capable of osteodifferentiation (C3H10-T1/2). Cell behaviour was evaluated in terms of MSC-matrix interactions and MSC commitment. Short-term cell adhesion, and subsequent cell differentiation were analysed by determining typical markers of osteoblastic and adipogenic differentiation, such as alkaline phosphatase, Runx2, type I collagen, fibronectin and PPAR γ 2.

Materials and methods

Cell culture

Mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells, subclone 4 (MC-4) were maintained in T75-flask, in alpha modified Eagle's medium (alphaMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM l-Glutamine, and antibiotics (50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. The mouse pluripotent mesenchymal stem cell line C3H10T1/2 (clone-8; American Type Culture Collection, LGC Promochem, Molsheim, France) was maintained in complete alphaMEM: supplemented with 10% FBS and 2 mM l-Glutamine, and antibiotics (50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C, and passaged before confluence. In these experiments, cells were used between passage 10 and 15.

LMHF stimulation

For mechanical stimulation experiments, MC3T3-E1 cells were trypsinised with 1x trypsin-EDTA and plated at 8,000 cells/cm² in 100 mm Petri dishes (Falcon), with 8ml of culture medium supplemented with 50 μ g/ml ascorbate phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Starting 24 h after seeding, MC3T3-E1 cells were subjected to LMHF loading induced by a buzzer (FARNELL 1193664 Ø=50mm) fixed under the Petri dish with a thin (12 μ m) doubled-sided adhesive tape. Petri dishes were supported by three soft plots to avoid interfering with buzzer movements. The sinusoidal input signal was controlled by a generator and amplified by a tension amplifier (Fig 1A). Signal frequency was chosen to match the resonance frequency of the Petri dish. For determination of resonance frequency, the experimental dish was excited by a computer-controlled gain phase analyzer (Hewlett-Packard HP 4194A). This gain phase analyzer applied a frequency sweep from 0 to 1000Hz and simultaneously recorded the gain. The excitation signals from the gain phase analyzer were amplified by a power amplifier (2100RF ENI inc. Rochester NY) in order to maximize the excitation absolute value. Vibrations of the Langevin transducer were measured with a laser-

vibrometer (Polytec). The reflect signals were processed by the electronic unit (OFV302), and fed to the test channel of the gain phase analyzer. The power amplifier output was also fed to the reference channel of the gain phase analyzer to measure gain. The maximum displacement (μm) of the centre of the Petri dish corresponded to the resonance frequency (400Hz) (Fig. 1B).

To quantitatively verify the load-induced strain fields ($\mu\epsilon$), strain gauges (KYOWA) were glued (Mbond 200 adhesive, Vishay Micromediation) inside the Petri dish. Three strain gauges were placed on the cultured surface along the radius, at the centre, at a point midway between the centre and the end support and at the edge of the Petri dish culture (Fig. 1C). These gauges were aligned tangentially to the radius in order to measure the Petri dish tangential deformation expressed as microstrain ($\mu\epsilon$). The strains on the Petri dish surface were precisely ($\pm 1\mu\epsilon$) recorded with a dynamic datalogger (Resist4000, Microlight, www.milight.com), which measured signals from strain gauges with 3 simultaneous channels; at a maximum rate of 4500 measurements/sec/channel. The datalogger is equipped with a serial link for transfer of data to a personal computer (PC) entirely compatible with Excel software. Osteoblast cultures were stimulated at 400Hz with a sinusoidal signal and the recorded strains were situated between ± 15 and $\pm 40 \mu\epsilon$ as shown in Figure 1C.

The tangential LMHF strain ($\mu\epsilon$) on the inner surface of the polystyrene substrates was qualitatively characterised by modelling (Fig. 1C). Modelling was performed by the Element Finite technique using ANSYS commercial software. The behaviour of the functional mode is shown in Figure 1C and is identified as the fundamental bending mode of the dish. According to the composite plate theory, the radial component of the tangential strain direction exhibited variations at each mechanical interface (a & b). Moreover, the presence of a strain nodal circle (r_0) indicated that the strain field was divided into 2 areas of opposite sign (i.e. a in extensive area for $r < r_0$ and a compressive area for $r > r_0$).

LMHF stimulation was applied 20 minutes once daily for 1, 3 or 7 days on osteoblast cultures (1dLMHF, 3dLMHF or 7dLMHF). During mechanical stimulation, cultures were maintained in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37 °C.

Cell growth and viability

Cell density was quantified after DAPI staining (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) at a working concentration of $1\mu\text{g/ml}$ by counting the nuclei at days 0, 1, 2, 3 and 7. Staining was examined with a Leitz DMRB fluorescence microscope. Images were acquired with a Roper Scientific CoolSnap/fx camera using Meta Imaging series 4.6.6. software.

Cell activity was studied on the same dishes after 3 and 7 days of culture. Cultures were washed twice with

culture media without phenol red and Alamar blue (AB) solution was added to this medium resulting to a final concentration of 10%. After incubation for 90 min at 37°C, the medium was collected and the absorbance was determined at 570 and 600 nm with a spectrophotometer (940 KONTRON). The percentage of AB reduction (%AB reduction) was calculated according to the manufacturer's protocol. The number of viable cells correlates with the magnitude of dye reduction and is expressed as percentage of control

Nitric oxide (NO) measurements

NO was measured as nitrite (NO_2^-) accumulated in the MC3T3 - conditioned culture medium. An aliquot (200 μl) of culture medium was collected after 3, 5 or 7 strain episodes. NO_2^- was assayed using Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylene-diamine-dihydrochloride). The reference curve was prepared by serial dilutions of nitrite standard solution (0.1 M sodium nitrite) using the culture medium as diluent. Absorbance was measured at 540 nm.

RNA extraction and RT-PCR

RNA extraction and RT-PCR were performed on MC3T3-E1 cells to quantify matrix mRNA expression and on C3H10T1/2 to analyse cell differentiation. MC3T3-E1 cells were harvested 12 hours after the last strain sequence and C3H10T1/2 cells were harvested after 2 days of preculture and 5 days in permissive culture.

Total RNA was isolated using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Purified RNA was dissolved in RNase-free water and its concentration was determined at 260 nm. RNA quality was checked on a 2% agarose gel with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide. Samples were stored at -80°C until use. Complementary DNA (cDNA) was synthesised from 2 μg of total RNA with the 1st strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche, Hague Road, Indianapolis). For quantitative Real Time PCR, 8 μl of cDNA mixture diluted to 1:20 in water was subjected to real-time PCR using SYBR Green I dye (Lightcycler faststart DNA master SYBR green I, Roche, Penzberg, Germany). Reactions were performed in 20 μl PCR mixture containing 4 μl 5x Master Mix (dNTP mixture with dUTP, MgCl_2 , SYBR Green I dye, Taq DNA Polymerase and reaction buffer), 2 μl of 10 μM primers. Primer sequences of mouse fibronectin, type I collagen, bone sialoprotein (bsp), osteopontin (opn), alkaline phosphatase (ALP), Runx2 and PPAR γ 2 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma 2) are listed in Table 1. Cyclophilin was used as control. Amplified products were examined for size estimation on a 2% agarose gel with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide and DNA molecular weight marker. Values are expressed as percent of control after normalisation to cyclophilin values.

Osteopontin immunoassay

Twenty four hours after the end of mechanical treatments, ELISA assays were performed to measure osteopontin in cell lysate and culture medium using the DuoSet mouse Osteopontin ELISA Development System (RD systems) according to the manufacturer's instructions. Cells were collected in lysis buffer composed of PBS with 0.5% Nonidet 40, and 1% PIC (proteases inhibition cocktail, Sigma, St Quentin Fallavier, France). PIC was also added to the culture medium (1%). Each sample was run in duplicate in the assays. Data were corrected for fresh culture medium or fresh lysis buffer values, and normalised to total protein content of the cell lysate measured with the BCA Protein Assay Kit (Interchim, Pierce).

Fluorescence labelling

For fibronectin immunostaining, cell layers were washed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature, washed, and incubated for 2 h with 1/100 diluted rabbit anti-mouse-FN (Sigma). After washing, cells were incubated for 1 h with 1/250 diluted alexa fluor488-tagged secondary antibody (Invitrogen).

For actin labelling, the cell layers were fixed in 4.0% paraformaldehyde, permeabilised with 0.1% Triton X-100 in PBS (3 min) and incubated for 45 min at 37 °C with a rhodamine-phalloidin (Interchim, Monluçon, France) stock solution (1/50 dilution).

For Vinculin or PPAR γ 2 immunostaining, cells were fixed and permeabilised with 70% methanol, washed and incubated for 2 h with primary antibodies. After washing, cells were incubated for 1 h with alexa fluor488.

Preparations were mounted in Fluokeep (Argene), examined by fluorescence microscopy (DMRB, Leica, Bensheim, Germany) and imaged by a camera (Roper Scientific CoolSnap α) using Meta Imaging series 4.6.6. software. Images were acquired in the ROI corresponding to area 1 (Fig. 1C).

DNA measurement

The Invitrogen PicoGreen DNA quantitation kit was used to measure double-stranded DNA concentrations in solution. All reagents (dsDNA reagent, TE buffer: 200mM Tris-HCl, 20mM EDTA, pH 7.5 and lambda DNA standard) were obtained from the kit and the assay was performed as described in the protocol. Data were corrected for cell-free values. Samples were placed in a black 96-well plate and excited at 485nm. Emission was measured at 538 nm using a fluorescent plate reader (Fluoroscan Ascent, Thermo Labsystems).

Culture of C3H10 T 1/2 on cell-free matrices

Matrices were prepared from MC3T3-E1 cultures after 7 days of LMHF and the corresponding unstrained cultures. The procedure for preparing cell-free matrix was modified from a published protocol [15]. Cultures were washed once with PBS and twice with wash buffer I (100 mM Na₂HPO₄, pH 9.6, 2 mM MgCl₂, 2 mM EDTA). Each dish was incubated at 37°C for 15 minutes in the presence of 8 ml lysis buffer (8 mM Na₂HPO₄, pH 9.6, 1% NP-40); then lysis buffer was replaced with 8 ml of fresh lysis buffer for 30-60 minutes. Matrices were washed four times with 8 ml H₂O. Matrices were used immediately or could be stored at 4°C in PBS containing 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin until needed. Decellularisation was controlled by nuclei DAPI staining. FN was immunostained to observe matrix topology and was quantified by image analysis, as described below. Non-decellularised matrices were observed in parallel.

C3H10T1/2 cells were plated at a density of 5,000 cells/cm² on tissue culture polystyrene (TCPS) or decellularised matrices and maintained 2 days in standard medium (preculture). The permissive medium (PM) was composed of αMEM supplemented with 10% FCS (PromoCell GMBH), 50 µg/ml ascorbic acid, 10⁻⁶ M β-glycerophosphate, 10⁻⁸ M all trans-retinoic acid, 10⁻⁸ M dexamethasone, 1% insulin, and 5.10⁻⁵ M 3-isobutyl-1-methylxanthine. Culture medium was changed every 2 days. On day 2, cultures were switched to the PM for both osteoblast and adipocyte differentiation.

Cell attachment

Calcein AM (Invitrogen) was used to label viable cells 2 hours post-seeding on cell-free matrix. Cells were washed with PBS and incubated for 20 min at 37°C with 4ml of 10µg/ml calcein. In live cells, nonfluorescent calcein AM is converted to a green-fluorescent calcein after acetoxymethyl ester hydrolysis by intracellular esterases. Cell attachment was controlled by fluorescent cell count using ImageJ software.

Image analysis

Image analysis was performed with ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Image analysis was applied for focal contacts area and number, fibronectin network measurements and counts. After improving image contrast, morphometric parameters, including cell size, cell area and cell perimeter were automatically measured by the computer program. Shape factors were generated from these data. The shape factor $4\pi(\text{area}/\text{perimeter}^2)$ assesses the deviation from circularity: a circle has a value of 1 and values approaching 0.0 indicate an increasingly elongated polygon. Feret Diameter indicates the longest distance between any two points along the cell.

Statistical analysis

Data were analysed with STATISTICA6 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). For MC3T3-E1 control and LMHF cultures, comparisons were performed with Mann–Whitney test. For C3H10T1/2 cultures on different substrates (TCPS, control matrix or LMHF matrix) group comparisons were performed with Kruskal-Wallis one-way analysis of variance. When p values were < 0.05 , *post hoc* comparisons among individual samples were performed with Mann–Whitney test with adjusted α value.

Results

Production and characterisation of LMHF strain

Due to the rigidity of Petri dishes, the resonance frequency had to be used for signal amplification. The resonance frequency of 100mm Petri dishes filled with 8ml of culture medium was measured at 400Hz, a frequency which produces a maximum vertical displacement (16 μm) of the centre of the Petri dish (Fig 1B). Modelling of tangential strain along the radius of the Petri dish showed compressive or extensive area on both side of the nodal circle at a fixed time (Fig.1C). Three strain gauges, positioned at various places in the inner surface of the polystyrene substrates, as shown in Fig. 1C, were used to measure strain magnitudes that were consistent with the models. As illustrated, the signal waveform induced a maximal strain of approximately $\pm 15 \mu\epsilon$ at the centre, $\pm 25 \mu\epsilon$ at midradius and $\pm 40 \mu\epsilon$ at the periphery. Area 1 (15 to $25 \mu\epsilon$) can be estimated to represent 75% of the inside surface of the Petri dish and area 2 (25 to $40 \mu\epsilon$) can be estimated to represent 25%.

MC3T3 E1 cells are sensitive to LMHF stimulation

The cell densities measured in control or mechanically stimulated cultures at days 1, 2, 3 or 7 are shown in Fig 2A. No significant difference was observed between controls and strained cultures regardless of the time-point tested. The cell population increased from about 8,900 cells/cm² at day 1 to 45,700 cells/cm² at day 3 and 75,400 cells/cm² at day 7 (Fig 2A) in both conditions. No significant difference was observed in the viability of cells cultured between control and LMHF cultures controlled after 3 or 7 days of culture (Fig 2B). NO release, a parameter of bone cell response to load, was assessed. A modest but significant increase in the NO accumulated in the culture medium was measured after 3 dLMHF, and was maintained after 5 and 7 days of LMHF (Fig 2C). Cytoskeleton organisation was assessed by actin labelling 15 min after the third session of LMHF (3 dLMHF). Control cells showed an abundance of straight aligned F-actin fibrils. In contrast, LMHF cells exhibited curled stress fibres, demonstrating that cells sense LMHF and respond by reorganisation of the cytoskeleton (Fig. 2D).

The number of focal contacts immunolabelled with vinculin antibodies was similar between the two conditions (data not shown), whereas the mean focal contact area was 40% higher in the LMHF group than in controls (Fig 2D).

Effects of LMHF on matrix gene expression and matrix protein production

A single 20-min strain sequence was sufficient to increase mRNA expression of FN (1.8-fold), OPN (1.7-fold) and BSP (1.5-fold) (Fig 3A). Fractionated application of LMHF was also tested: when stimulation was divided into ten 2-minute sessions over 20 hours, a less marked increase of FN and BSP mRNA was also observed (data not shown). One daily 20-min LMHF sequence was therefore used for the following experiments. The increase in FN mRNA was maintained after 3 and 7 dLMHF whereas OPN mRNA and BSP mRNA returned to control levels after 3 dLMHF. A late response for type I collagen expression was noted with a 1.7-fold increase after 7 dLMHF (Fig 3D).

OPN protein production was enhanced in the insoluble fraction after 3 dLMHF, in line with the increased mRNA expression measured after the first LMHF sequence (Fig 3C).

LMHF strain alters matrix organisation

FN immunolabelling was performed in order to visualise the matrix network after 3 and 7 days of LMHF of MC3T3 cultures. Images showed initiation of matrix organisation according to an alveolar pattern after 3dLMHF (data not shown), that further progressed after 7 dLMHF of the cultures (Fig 4A). Following decellularisation treatment, no nuclear material was observed in the matrix, as visualised by DAPI staining (Fig 4A) demonstrating complete efficiency of the decellularisation process. FN imaging showed that the characteristic pattern with larger alveoli was maintained.

Quantitative analysis of the fibronectin pattern was performed on the matrices after decellularisation. Measurement of alveolar area (Fig 4B) revealed that the mean area of the largest (>5000 pixel²) alveoli was 2-fold increased in 7 dLMHF cultures (Fig 4B), whereas the smallest alveoli (<5000 pixel²) had similar mean areas in both matrices. These analyses revealed that the matrix pattern was reorganised during mechanical stimulation.

Short-term behaviour of MSCs grown on matrix produced under LMHF

To evaluate the osteogenic properties of ECM, C3H10T1/2 MSCs were plated on acellular ECM from control and 7 dLMHF. cultures. MSCs seeded on tissue culture plastic substrate (TCPS) were used as a reference. Calcein staining 2 hours post-seeding allowed analysis of both cell morphology and attachment. Observation of

cell shape showed round cells on TCPS substrate, whereas cells displayed a stellar morphology on both control and LMHF matrices (Fig. 5A). No obvious morphological difference was observed at this stage between the two matrix conditions. The initial attachment of MSCs was also quantified 2 hours post-seeding. An increase in cell number was observed for cells seeded on both matrices compared to TCPS. Moreover, the number of adherent cells on LMHF matrix was significantly increased in comparison to control matrix. Focal contacts were assessed 6 hours post-seeding. Vinculin staining showed no focal contact for cells seeded on TCPS at this early time-point, while focal adhesions were clearly visible on cells seeded on both matrices. Focal contact number was 50% higher in cells seeded on LMHF matrix compared to cells seeded on control matrix (Fig. 5B). After 16 hours, morphological changes of C3H10T1/2 seeded on the various substrates were quantified using actin labelling. MSC on both matrices exhibited more filopodia, lamellipodia, and cellular extensions compared to those seeded on TCPS. Cell morphology appeared similar on both matrices but parameters measured by image analysis highlighted differences in cell shape between the matrices: LMHF matrices induced an increase in circularity and a decrease in perimeter and Feret diameter compared to control ECM, while no difference in cell area was observed.

MSCs growth and differentiation on matrix produced under LMHF

Cell density of MSCs grown on TCPS, control or LMHF matrices was assessed by DNA quantification after 5 days in PM. At this time, the cell numbers in control and LMHF matrices were slightly lower than on TCPS (Fig 6A). Cell number was similar in control and LMHF matrix, showing that the mechanically microdeformed matrix did not exert a proliferative effect on MSC.

MSC differentiation was studied under the same conditions. The commitment towards the adipocyte lineage was assessed by analysis of PPAR γ 2 protein and mRNA levels. PPAR γ 2 protein was expressed equally on TCPS and control matrix. However, PPAR γ 2 protein expression was downregulated in cultures on LMHF matrix (Fig 6B) compared to TCPS or control matrix. This was corroborated by a two fold decrease in PPAR γ 2 mRNA (Fig 6C). The commitment of MSCs towards the osteoblastic lineage was revealed by increased levels of mRNA for osteoblast markers: Runx2 mRNA expression was higher on both matrices compared to TCPS, but the LMHF matrix did not improve Runx2 mRNA expression (Fig 6C). Comparison between TCPS and control matrices showed that ALP and FN were not stimulated by the matrix, and collagen was slightly increased. However, both ALP, type I collagen and FN were increased in MSCs grown on LMHF matrix compared to control ECM (Fig 6C). Upregulation of these genes on LMHF matrix therefore indicates progression towards an osteoblastic phenotype.

Discussion

In this study, a mechanical loading system was developed to produce LMHF stimulations set in a range which has not yet been obtained by previously described devices. The mechano-responsiveness of bone has been recognised for a long time, and it has been subsequently presumed that a threshold of $1000\mu\epsilon$ would have to be exceeded to become anabolic [16], while strains below this level of deformation were considered insufficient to retain tissue morphology. Recent work also suggests an anabolic potential of vibratory mechanical signals ($<5\mu\epsilon$) [11]. Numerous techniques to induce mechanical deformation of osteoblasts *in vitro* have been described in the literature, but all devices generate high magnitude deformation: strain magnitudes between 200 to $40,000\mu\epsilon$ [17, 18]. This study was conducted in a range of physiological microdeformations. With the device described here, osteoblastic responses were examined for deformations of about $20\mu\epsilon$, which is much lower than the threshold considered to be osteogenic in the literature. This system has the advantage of being easy to set up, as the buzzers and Petri dishes used are commercially available. Very precise measuring systems and modelling allow accurate determination of the microdeformations experienced by the cells. However, this system also presents certain limitations, like many other mechanical stress systems used for cell cultures, as the generated LMHF were not completely homogeneous over the culture substrate, but varied over a very narrow range. Moreover, this study was unable to consider in detail the physical differences of the effects of fluid shear stress or mechanical strain on bone cell deformation.

The high frequency resonance (400Hz) of our system compensated for the loss in strain amplitude. Bone cells respond to high-frequency strain (i.e., 400 Hz), although high frequencies in the spectrum of loading during movements of high impact activity, such as exercise and sports, might involve lower frequencies. With certain adaptations, this system could be used to generate lower frequencies inducing deformations of similar magnitude, which would provide information about the threshold of responsiveness of osteoblasts in terms of frequency. However, the use of higher frequencies for an *in vitro* study did not appear to be a problem, as the primary objective was to produce an osteogenic matrix for MSCS cells, and this frequency does not appear to be harmful to MC3T3 cells. This study demonstrates the responsiveness of osteoblasts to LMHF signals, as reflected by nitric oxide release, cytoskeleton and focal adhesion modifications. Only one study [11] has reported *in vitro* osteoblast mechanosensing of a LMHF mechanical regimen. Although this mechanical regimen differed from that used in our study, as the magnitude of vibrations was less than $5\mu\epsilon$ and over a wide range of frequencies (5 to 100 Hz), Bacabac showed that NO release by MC3T3-E1 cells was significantly increased for

the higher frequency. Under our conditions, the amount of nitrite secreted after 1 dLMHF was below the limit of detection, but an increase of nitrite accumulating in the culture medium was assessed after a longer mechanical stimulation, demonstrating the threshold responsiveness of osteoblasts to LMHF. Mechanical strain is known to induce changes in cytoskeleton organisation, and more specifically, actin bundles can be restructured by mechanical stretching [19]. MC3T3 cells displayed a well organised actin fibre pattern under basal conditions when grown on plastic, so that reinforcement was not obvious after LMHF, but the curling appearance of the actin cytoskeleton observed after 7dLMHF clearly demonstrated that the polymerisation / depolymerisation process was affected by mechanical loading. A similar actin fibre pattern has been observed in MC3T3 cells after exposure to ultrasound [20]. Vinculin, a plasma membrane-associated protein found in adhesion complexes [21], was selected as marker of LMHF responsiveness based on previous investigations showing that focal contacts can be reorganised by mechanical stretching [22]. Three days of LMHF increased the size of vinculin-positive focal contacts, consistent with this previous study that reported a sustained increase in vinculin spot area in stretched osteoblasts. This increase resulted from clustering of small and probably less mature contacts. The number of spots was not affected at this time-point, suggesting that the mechanically-induced increase in vinculin spot number is early but transient as noted by Guignandon. Stress fibres and their associated focal adhesions therefore play a role in LMHF-signal transduction mechanism.

LMHF loading was used to alter matrix synthesis. MC3T3-E1 cells were chosen for their ability to produce an abundant extracellular matrix and for their responsiveness to a large panel of mechanical stimulations [10, 23, 24]. Information can be provided by both quantitative and qualitative ECM modifications. In this study, LMHF stimulations initially enhanced osteopontin, bone sialoprotein and fibronectin gene expression and then collagen mRNA. The increase in osteopontin gene expression was confirmed at the protein level. While the quantitative aspect is generally taken in account [25, 26], alteration of the matrix network by mechanical stimulation is still poorly documented. One study [27] reported thickening of fibronectin fibres on osteoblast cultures submitted to physiological mechanical stimulation. The image analysis used here allowed characterisation of the ECM by the alveolisation pattern. LMHF provided larger alveoli in matrices, and this altered pattern was not an artefact due to decellularisation, as it was observed before and after removing the cells. We concluded that LMHF not only enhanced expression of major bone matrix proteins (collagen, OPN, BSP, FN), but also induced an obvious reorganisation of the FN network.

To evaluate the potential functional role of LMHF stimulation of the ECM, we studied the behaviour of MSCs seeded onto decellularised matrices. Murine C3H10T1/2 cells are good candidates to test matrix-induced

osteogenic differentiation, as the pluripotent differentiation capability of C3H10T1/2 cells is comparable to that of primary bone marrow-derived MSCs [28].

An explanation for the positive effect of the microdeformed matrix on MSC osteogenesis required analysis of MSC initial adhesion and focal contact structures, which both influence cell behaviour [29, 30]. ECM coating with natural or synthetic proteins is known to exert a proadhesive effect for a wide range of cells [31, 32], but this effect has not yet been documented for MSCs. The proadhesive quality of the *in vitro* generated bone-like extracellular matrix was demonstrated here: MSCs initial adhesion (i.e. two hours after seeding) was more efficient on control matrices compared to TCPS, and focal contacts were already present after 6 hours, but were not detected on TCPS. Thus, matrices retained their adhesive properties despite the decellularisation process and, as expected, supported a better short-term adhesion of MSCs. Most importantly, LMHF stimulation provided additional adhesive properties to the ECM, as reflected by enhanced MSC attachment at the very beginning of the culture (2h), and by the larger number of focal contacts compared to control ECM. These improved adhesive properties of LMHF matrices were confirmed with another cell line (MC3T3-E1, data not shown).

Cell morphology was then analysed as an indicator of the commitment towards osteoblastic/adipogenic lineage [33]. A round cell shape was associated with adipogenic differentiation [34]; while a stellate MSC morphology, as observed on both matrices, indicates loss of the adipogenic phenotype.

The composition of the ECM could affect MSC recruitment: OPN and BSP have been implicated as key proteins for mediating cellular adhesion, notably at bone-implant interfaces [35]. LMHF regimen enhanced BSP and OPN gene expression. Both proteins might play important roles in cell binding to the collagen matrix. However, Bernards et al. [36] showed that the MC3T3 E1 cell binding on collagen-coated TCPS is enhanced on substrates with adsorbed OPN compared to BSP. The present study clearly demonstrated that LMHF stimulation increased OPN in the insoluble fraction, suggesting that it is incorporated into the ECM and could therefore improve MSC adhesion. Matricellular proteins including OPN modulate cell function, but do not appear to contribute *per se* to the organisation or physical properties of ECM structures [37]. However, the binding of OPN to structural ECM proteins such as collagen and fibronectin [38, 39] will orient one protein with respect to another. This matrix-bound OPN would gain a preferential orientation/conformation for cell adhesion after LMHF.

The involvement of structural proteins, specifically FN, a glycoprotein promoting cellular attachment, was considered quantitatively and topologically in this study. During MSC osteogenesis processes *in vivo*, the ECM surrounding the cells is dynamically remodelled [40]. Fibronectin is observed early in the region of mesenchymal condensation [41]. One hypothesis for the matrix-induced cell commitment towards the osteoblastic lineage is that reorganisation of the fibronectin network in the LMHF cultures facilitates the specific

engagement of $\alpha_5\beta_1$ integrin of MSC. Previous studies [42] [43] have shown that modulation of fibronectin conformation, including alterations in the cell binding domain to FN, directs cell proliferation and differentiation. Recently, Martino [44] indicated that $\alpha_5\beta_1$ integrin influences human MSC behaviour: blockade of α_5 and β_1 lead to decreased ALP activity, demonstrating the capacity of $\alpha_5\beta_1$ integrin-specific engagement to drive intracellular signalling events toward cell differentiation.

The molecular mechanisms which dictate the osteogenic differentiation of MSC are largely unknown. Inducers of differentiation towards one lineage inhibit cell differentiation towards alternative lineages. For example, the canonical Wnt/beta-catenin pathway induces osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis, whereas the peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR-gamma) is a prime inducer of adipogenesis and, as shown in recent studies, inhibits osteoblastogenesis [45, 46]. Indeed, we observed, one week after MSCs plating, upregulation of type I collagen, ALP and FN with concomitant downregulation of PPAR γ 2. Runx2 expression was not altered at this time, but this does not preclude an earlier and transient upregulation [47]. We suggest that, after one week, remodelling of the acellular matrix via *de novo* synthesis of ECM proteins had occurred and probably played an important role in orienting towards osteogenic rather than adipogenic differentiation.

The complexity of matrices raises a difficult challenge to precisely identify the added value of LMHF matrix in terms of composition and topography. Various strategies have been proposed to further our understanding of the role of environment in MSC differentiation. Simplified models using substrate coating with ECM components can be used to study the influence of the nature of substrate. For example, adhesion to ECM components such as laminin, collagen type I or vitronectin can induce osteogenic differentiation of hMSC [14], [48]. The influence of nano- or micro-topography on cell commitment was studied on synthetic substrates with ultra-precise nanofeatures [49]. For example, nanotopography of various symmetries and with varying degrees of disorder affect MSC adhesion and osteoblastic differentiation: random nanotopographies increases osteospecific differentiation compared to ordered nanotopographies [50]. Similarly, osteoblast differentiation is induced on poly(l-lactic acid) nanofibrous matrix, versus afibrillar substrate [51]. Nevertheless, these models fail to reproduce the complex structure necessary for the natural environment of stem cells. In the present study, the starting material was a natural matrix, with its complex composition and ultrastructure, and these two aspects of the matrix can be subtly modified by physical intervention, close to the physiological conditions. This work showed that LMHF is an effective and useful strategy to modify the cell-produced ECM to modulate MSC behaviour. ECM partially constitutes the stem cell niche. The use of 3D configured ECM will significantly enhance our understanding of how stem cells interact with and respond to the ECM niche. Studies currently underway to further characterise these natural extracellular matrices, and to understand their structure,

composition and function, could provide an important contribution to optimal synthesis of biomaterials designed to replace or regenerate tissues.

Conclusion

This *in vitro* study demonstrates the anabolic effects of LMHF stimulations on osteogenesis, especially on the extracellular matrix produced by osteoblasts. The mechanical stimulation described in this study can be used as a tool to improve ECM qualities such as MSC capture and to direct stem cell differentiation towards osteogenesis. Low-magnitude stimulation is fully adapted to the field of bone tissue engineering for the development of scaffolds such as macroporous ceramics or bioglass that display poor mechanical resistance. LMHF stimuli could therefore be an approach to functionalise breakable biomaterials by providing osteoinductive properties via the production of an osteogenic ECM interface.

Acknowledgements

Virginie Dumas held a research fellowship from La Region Rhone Alpes.

References

1. Frost HM (2003) Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 275:1081-1101
2. Torcasio A, van Lenthe GH, Van Oosterwyck H (2008) The importance of loading frequency, rate and vibration for enhancing bone adaptation and implant osseointegration. *Eur Cell Mater* 16:56-68
3. Fritton SP, McLeod KJ, Rubin CT (2000) Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains. *J Biomech* 33:317-325
4. Rubin C, Turner AS, Bain S, Mallinckrodt C, McLeod K (2001) Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature* 412:603-604
5. Judex S, Boyd S, Qin YX, Turner S, Ye K, Muller R, Rubin C (2003) Adaptations of trabecular bone to low magnitude vibrations result in more uniform stress and strain under load. *Ann Biomed Eng* 31:12-20
6. Qin, Y. X., C. T. Rubin, et al. (1998). "Nonlinear dependence of loading intensity and cycle number in the maintenance of bone mass and morphology." *J Orthop Res* 16(4): 482-9.
7. Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K (2004) Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *J Bone Miner Res* 19:343-351
8. Verschueren SM, Roelants M, Delecluse C, Swinnen S, Vanderschueren D, Boonen S (2004) Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study. *J Bone Miner Res* 19:352-359
9. Prisby RD, Lafage-Proust MH, Malaval L, Belli A, Vico L (2008) Effects of whole body vibration on the skeleton and other organ systems in man and animal models: what we know and what we need to know. *Ageing Res Rev* 7:319-329
10. Bacabac RG, Van Loon JJ, Smit TH, Klein-Nulend J (2009) Noise enhances the rapid nitric oxide production by bone cells in response to fluid shear stress. *Technol Health Care* 17:57-65
11. Bacabac RG, Smit TH, Van Loon JJ, Doulabi BZ, Helder M, Klein-Nulend J (2006) Bone cell responses to high-frequency vibration stress: does the nucleus oscillate within the cytoplasm? *Faseb J* 20:858-864
12. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004) Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4:743-765

13. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294:1708-1712
14. Salaszyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE (2004) Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol* 2004:24-34
15. Mao Y, Schwarzbauer JE (2005) Stimulatory effects of a three-dimensional microenvironment on cell-mediated fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Sci* 118:4427-4436
16. Turner CH, Forwood MR, Rho JY, Yoshikawa T (1994) Mechanical loading thresholds for lamellar and woven bone formation. *J Bone Miner Res* 9:87-97
17. Brown TD (2000) Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J Biomech* 33:3-14
18. Tanaka SM (1999) A new mechanical stimulator for cultured bone cells using piezoelectric actuator. *J Biomech* 32:427-430
19. Sato K, Adachi T, Matsuo M, Tomita Y (2005) Quantitative evaluation of threshold fiber strain that induces reorganization of cytoskeletal actin fiber structure in osteoblastic cells. *J Biomech* 38:1895-1901
20. Yang RS, Lin WL, Chen YZ, Tang CH, Huang TH, Lu BY, Fu WM (2005) Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone* 36:276-283
21. Mierke CT (2009) The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells. *Cell Biochem Biophys* 53:115-126
22. Guignandon A, Akhouayri O, Usson Y, Rattner A, Laroche N, Lafage-Proust MH, Alexandre C, Vico L (2003) Focal contact clustering in osteoblastic cells under mechanical stresses: microgravity and cyclic deformation. *Cell Commun Adhes* 10:69-83
23. Jackson RA, Kumarasuriyar A, Nurcombe V, Cool SM (2006) Long-term loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Cell Physiol* 209:894-904
24. Tang L, Lin Z, Li YM (2006) Effects of different magnitudes of mechanical strain on Osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 344:122-128
25. Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S (2008) Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *J Biomech* 41:1095-1103
26. Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Schmidt C, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Friemert B, Claes L (2005) Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials* 26:311-318
27. Di Palma F, Guignandon A, Chamson A, Lafage-Proust MH, Laroche N, Peyroche S, Vico L, Rattner A (2005) Modulation of the responses of human osteoblast-like cells to physiologic mechanical strains by biomaterial surfaces. *Biomaterials* 26:4249-4257
28. Zhao L, Li G, Chan KM, Wang Y, Tang PF (2009) Comparison of multipotent differentiation potentials of murine primary bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cell line C3H10T1/2. *Calcif Tissue Int* 84:56-64
29. Buckbinder L, Crawford DT, Qi H, Ke HZ, Olson LM, Long KR, Bonnette PC, Baumann AP, Hambor JE, Grasser WA, 3rd, Pan LC, Owen TA, Luzzio MJ, Hulford CA, Gebhard DF, Paralkar VM, Simmons HA, Kath JC, Roberts WG, Smock SL, Guzman-Perez A, Brown TA, Li M (2007) Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates osteoprogenitor cells and bone formation, and offers an anabolic treatment approach for osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10619-10624
30. Kim JB, Leucht P, Luppen CA, Park YJ, Beggs HE, Damsky CH, Helms JA (2007) Reconciling the roles of FAK in osteoblast differentiation, osteoclast remodeling, and bone regeneration. *Bone* 41:39-51
31. Garcia AJ, Keselowsky BG (2002) Biomimetic surfaces for control of cell adhesion to facilitate bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 12:151-162
32. Roessler S, Born R, Scharnweber D, Worch H, Sewing A, Dard M (2001) Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. *J Mater Sci Mater Med* 12:871-877

33. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS (2004) Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 6:483-495
34. Koutnikova H, Auwerx J (2001) Regulation of adipocyte differentiation. *Ann Med* 33:556-561
35. Puleo DA, Nanci A (1999) Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 20:2311-2321
36. Bernards MT, Qin C, Ratner BD, Jiang S (2008) Adhesion of MC3T3-E1 cells to bone sialoprotein and bone osteopontin specifically bound to collagen I. *J Biomed Mater Res A* 86:779-787
37. Bornstein P, Sage EH (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14:608-616
38. Mukherjee BB, Nemir M, Beninati S, Cordella-Miele E, Singh K, Chackalaparampil I, Shanmugam V, DeVouge MW, Mukherjee AB (1995) Interaction of osteopontin with fibronectin and other extracellular matrix molecules. *Ann N Y Acad Sci* 760:201-212
39. Chen Y, Bal BS, Gorski JP (1992) Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem* 267:24871-24878
40. Nakamura M, Sone S, Takahashi I, Mizoguchi I, Echigo S, Sasano Y (2005) Expression of versican and ADAMTS1, 4, and 5 during bone development in the rat mandible and hind limb. *J Histochem Cytochem* 53:1553-1562
41. Sasano Y, Li HC, Zhu JX, Imanaka-Yoshida K, Mizoguchi I, Kagayama M (2000) Immunohistochemical localization of type I collagen, fibronectin and tenascin C during embryonic osteogenesis in the dentary of mandibles and tibias in rats. *Histochem J* 32:591-598
42. Stephansson SN, Byers BA, Garcia AJ (2002) Enhanced expression of the osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding. *Biomaterials* 23:2527-2534
43. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ (2005) Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5953-5957
44. Martino MM, Mochizuki M, Rothenfluh DA, Rempel SA, Hubbell JA, Barker TH (2009) Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials* 30:1089-1097
45. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ (2009) Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci* 66:236-253
46. David V, Martin A, Lafage-Proust MH, Malaval L, Peyroche S, Jones DB, Vico L, Guignandon A (2007) Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* 148:2553-2562
47. Pregizer S, Baniwal SK, Yan X, Borok Z, Frenkel B (2008) Progressive recruitment of Runx2 to genomic targets despite decreasing expression during osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 105:965-970
48. Klees RF, Salaszyk RM, Kingsley K, Williams WA, Boskey A, Plopper GE (2005) Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 16:881-890
49. Dalby MJ, Gadegaard N, Curtis AS, Oreffo RO (2007) Nanotopographical control of human osteoprogenitor differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2:129-138
50. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, Wilkinson CD, Oreffo RO (2007) The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* 6:997-1003
51. Hu J, Liu X, Ma PX (2008) Induction of osteoblast differentiation phenotype on poly(L-lactic acid) nanofibrous matrix. *Biomaterials* 29:3815-3821

Figure 1

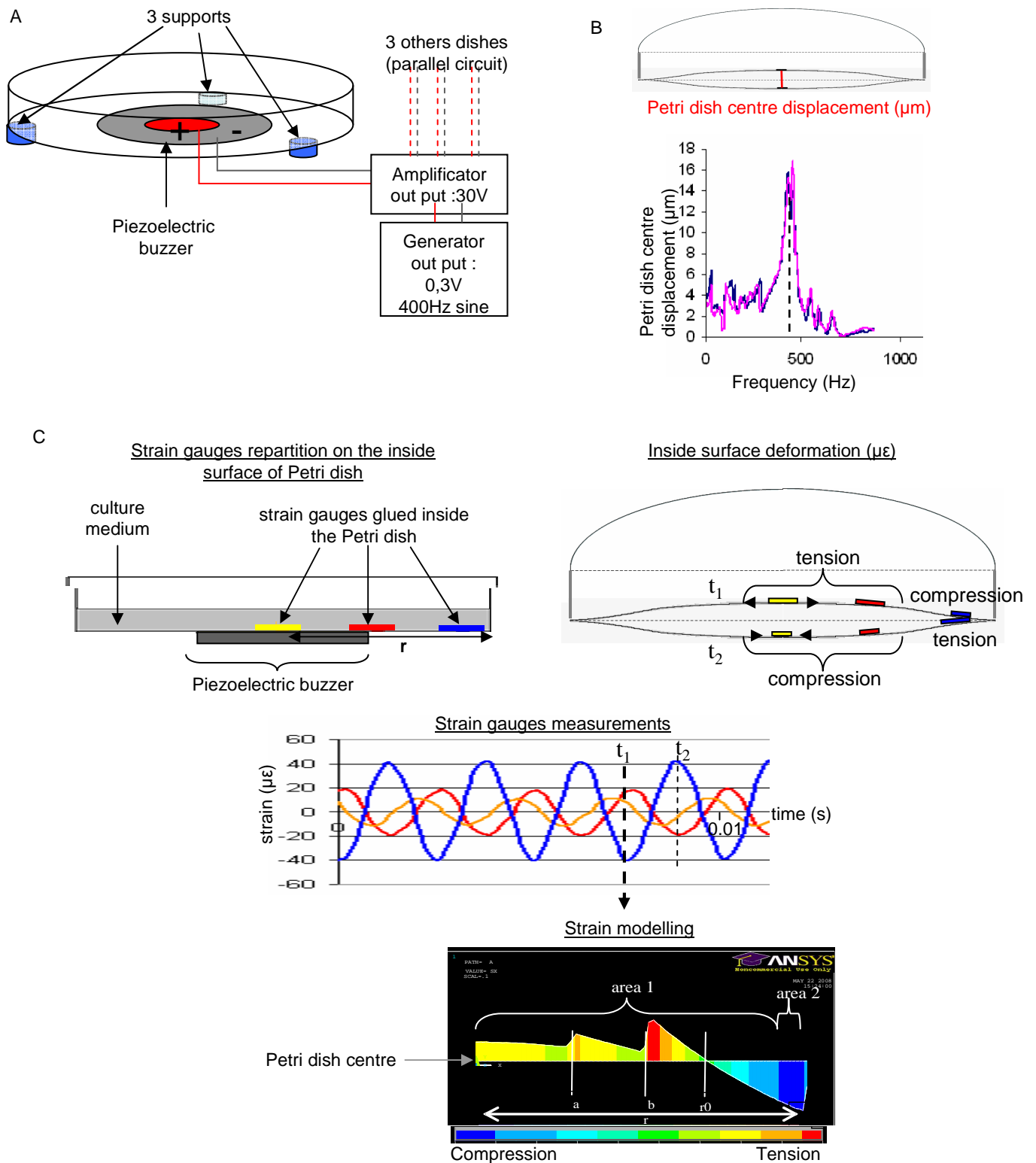


Figure 1: Production and characterisation of micromechanical stimulation

(A)Diagram of the mechanical stimulator with four Petri dishes in parallel. A generator connected to an amplifier produces a sinusoidal tension (± 30 Volts) for each buzzer fixed under the Petri dish.

(B) Determination of Petri dish resonance frequency. Petri dishes were filled with 8ml of culture medium. Displacement of the centre of the Petri dish was measured for frequencies ranging from 0 to 1000 Hz. The blue and pink curves represent measurements on two different Petri dishes.

(C)Strain gauges repartition: Three gauges were positioned along the radius inside the strained surface: at the centre, at a point midway between the centre and the end support and at the edge of the Petri dish. Surface deformation: The strained surface was represented at t_1 and t_2 showing alternatively compression and tension.

Strain gauges measurements: The graph represents the measurements of the three strain gauges during 0.01 second (s) at resonance frequency.

Strain modelling: it represents the tangential strain along the radius (r) at fixed time (t_1). Mechanical interfaces are represented by lines a and b which corresponds respectively to the piezoelectric material and total surface of the buzzer. r_0 indicates the strain nodal circle. The area 1 corresponds to strains from 15 to $25\mu\epsilon$ and area 2 corresponds to strains from 25 to $40\mu\epsilon$.

Figure 2

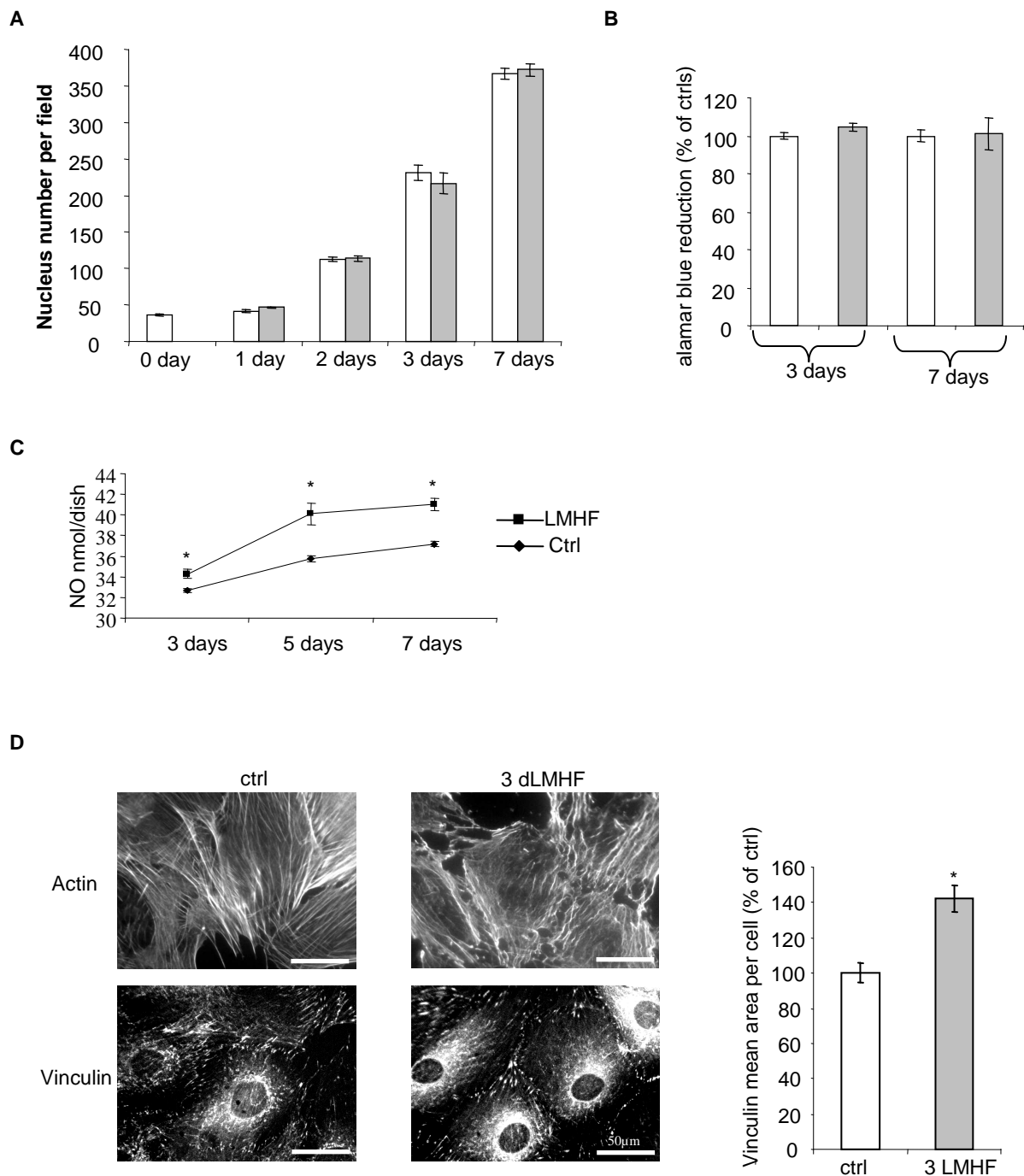


Figure 2: MC3T3 E1 are sensitive to micromechanical stimulation

- (A) Cell density of MC3T3 unstrained or strain culture (1dLMHF, 2dLMHF, 3dLMHF or 7dLMHF). Unstrained (empty bars) and strained (grey bars) cultures were grown in parallel. Quantification of cell nuclei $n=3$ 10 fields mean \pm SEM.
- (B) Cell viability of unstrained or strain culture (3dLMHF or 7dLMHF). Unstrained (empty bars) and strained (grey bars) cultures were grown in parallel. *: $p<0.05$ vs control. $n=4$ $p<0.05$ mean \pm SEM.
- (C) Nitric oxide accumulation in culture medium of unstrained (—◆—) or strain culture (—■—) (3dLMHF, 5dLMHF or 7dLMHF). Unstrained and strained cultures were grown in parallel. *: $p<0.05$ vs control. $n=6$, $p<0.05$ mean \pm SEM.
- (D) Actin and vinculin immunostaining on unstrained culture (ctrl) or 3 dLMHF culture and quantification of immunolabelled vinculin area per cell $n=3$, 10 fields per dish mean \pm SEM.

Figure 3

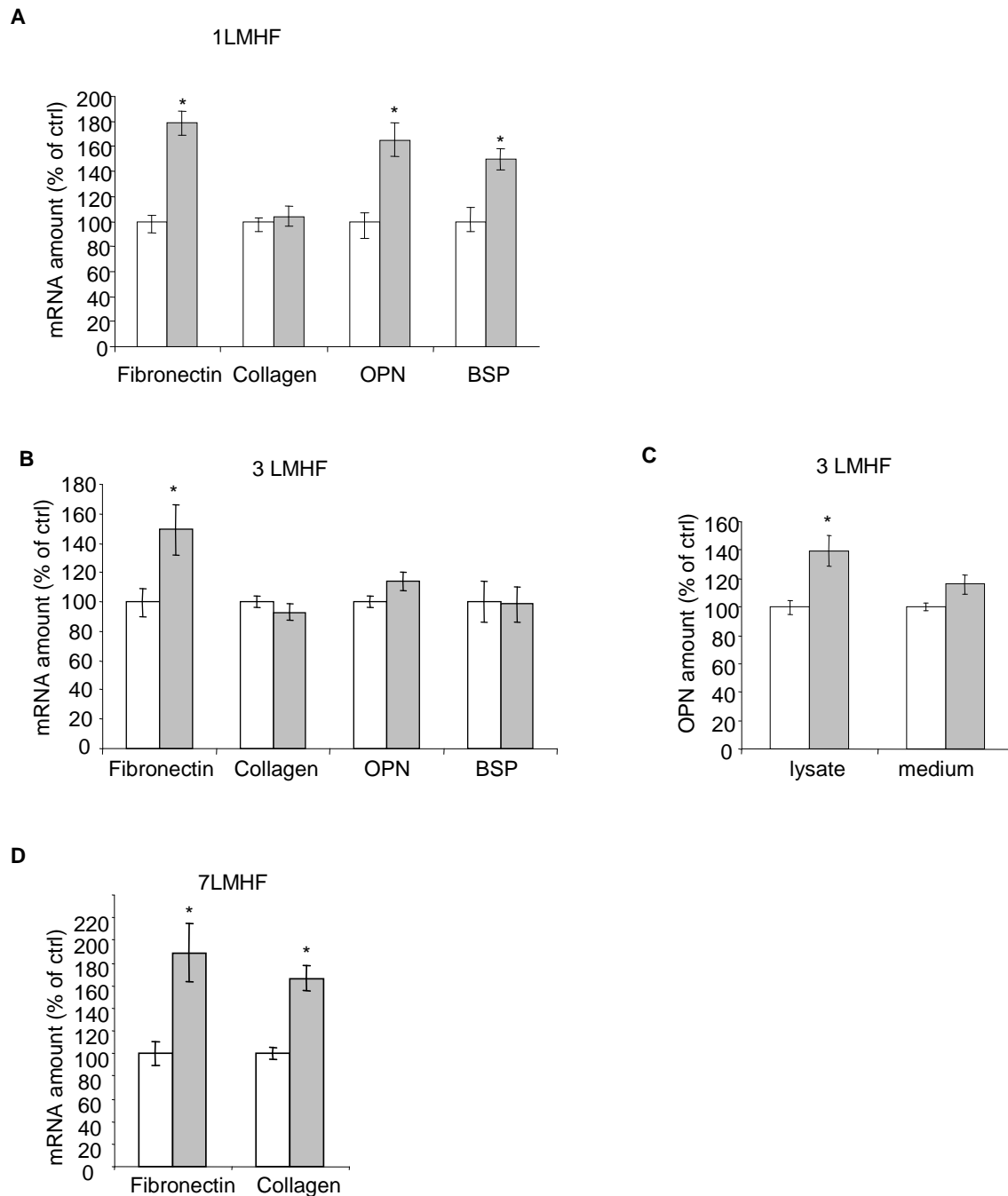


Figure 3: Effects of LMHF on matrix gene expression and matrix protein production in MC3T3-E1 cultures

(A) Matrix protein mRNA levels in 1dLMHF MC3T3E1 cells. Cultures were strained for one episode and analysis was performed 12h post-strain. Unstrained (empty bars) and strained (grey bars) cultures were grown in parallel. Values were normalized to cyclophilin mRNA level and expressed as a ratio to controls (Ctrl). *: $p < 0.05$ vs control $n = 7$ mean \pm SEM.

(B) Matrix protein mRNA levels in 3dLMHF MC3T3E1 cells. Cultures were strained for 3 episodes and analysis was performed 12h post-strain. Unstrained (empty bars) and strained (grey bars) cultures were grown in parallel. Values were normalized to cyclophilin mRNA level and expressed as a ratio to controls (Ctrl). *: $p < 0.05$ vs control $n = 4$ mean \pm SEM.

(C) OPN protein was measured in lysate and in culture medium after 3dLMHF. Unstrained (empty bars) and strained (grey bars) cultures were grown in parallel. Results are normalized on total cellular protein content and expressed as a ratio to controls (Ctrl). *: $p < 0.05$ vs control $n = 4$ mean \pm SEM.

(D) Matrix protein mRNA levels in 7dLMHF MC3T3E1 cells. Cultures were strained for 7 episodes and analysis was performed 12h after the last strain. Unstrained (empty bars) and strained (grey bars) cultures were grown in parallel. Values were normalized to cyclophilin mRNA level and expressed as a ratio to controls (Ctrl). *: $p < 0.05$ vs control. $n = 3$. mean \pm SEM.

Figure 4

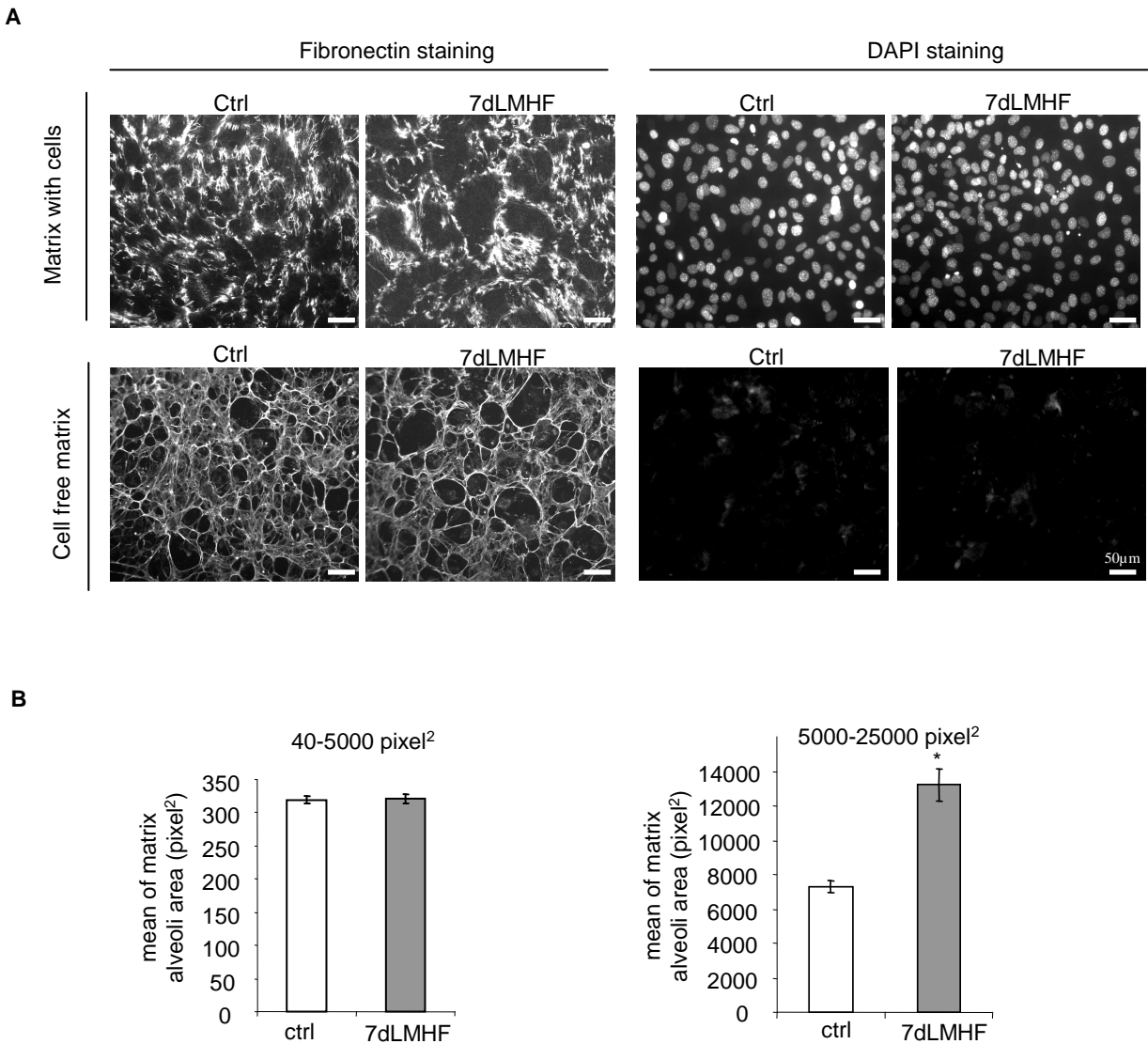


Figure 4: Effects of LMHF stimulation on matrix organisation.
(A) Immunolabelled fibronectin network and DAPI staining on control (Ctrl) and strain cultures (7dLMHF) for matrix with cells or cell-free matrix.
(B) Mean of matrix alveoli areas in cell-free matrices of control (empty bars) and 7dLMHF cultures (grey bars) mean \pm SEM. area alveoli were separated into 2 size categories: small (40-5000 pixel²) and large (5000-25000 pixel²) alveoli.

Figure 5

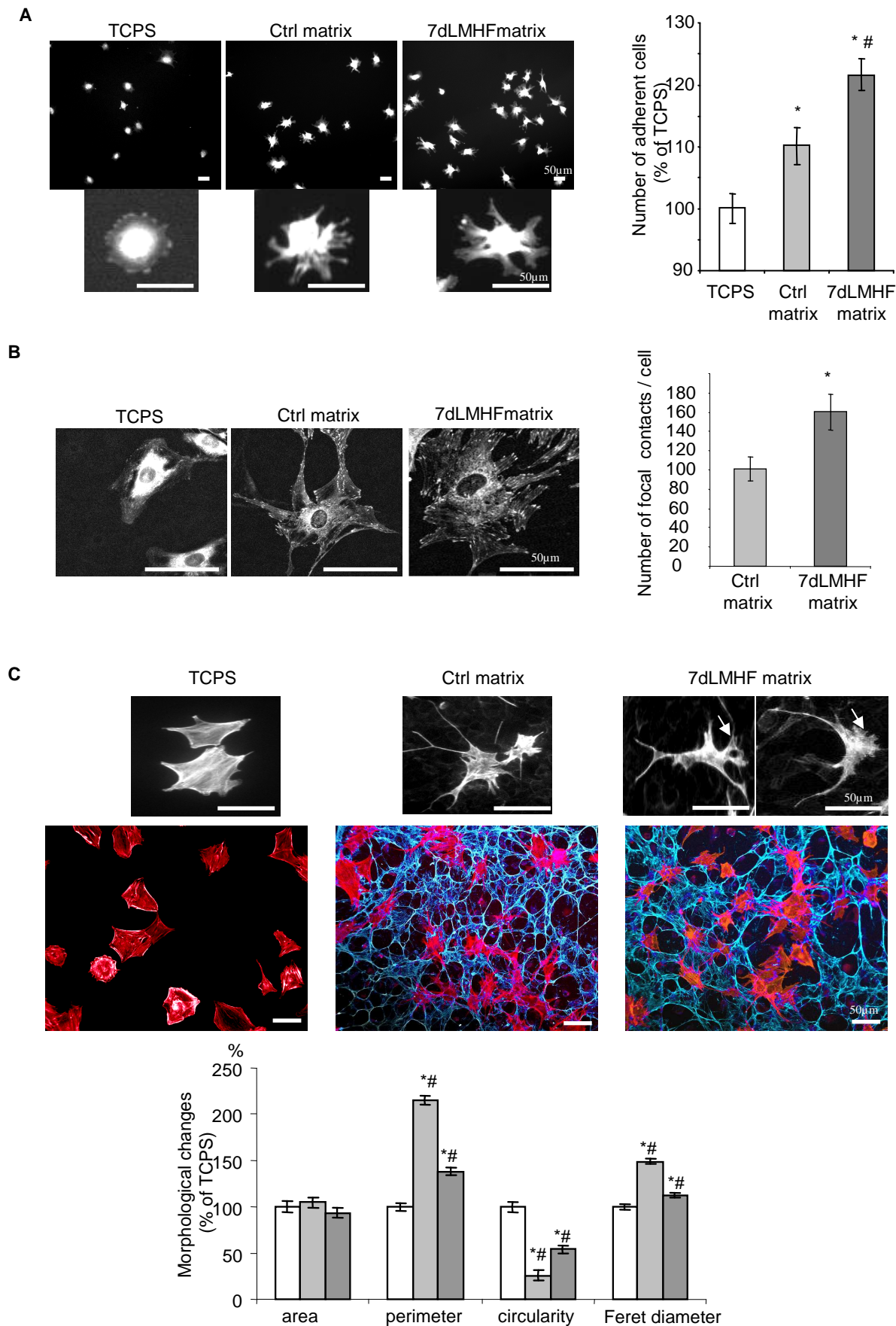


Figure 5: Short-term behaviour of C3H10T1/2 grown on matrix produced under LMHF

(A) Morphology and number of adherent C3H10T1/2 cells 2 hours post-seeding (calcein staining). Results are expressed as a ratio to control. $p < 0.05$ * vs TCPS, # vs matrix ctrl. $n = 3$, 15 fields per dish, mean \pm SEM).

(B) Quantification of focal adhesions (vinculin) per cell 6 hours post-seeding $n = 35$ cells mean \pm SEM.

(C) Actin staining 16h post-seeding. White arrows show cytoplasmic extensions. Below, an overlay of fibronectin network and actin. Quantitative analysis of the morphology of C3H10T1/2 cultured on TCPS (empty bars), control matrix (bright grey bars) and strain matrix (dark grey bars) $n = 200$ cells, mean \pm SEM $p < 0.05$ * vs TCPS, # vs matrix ctrl.

Figure 6

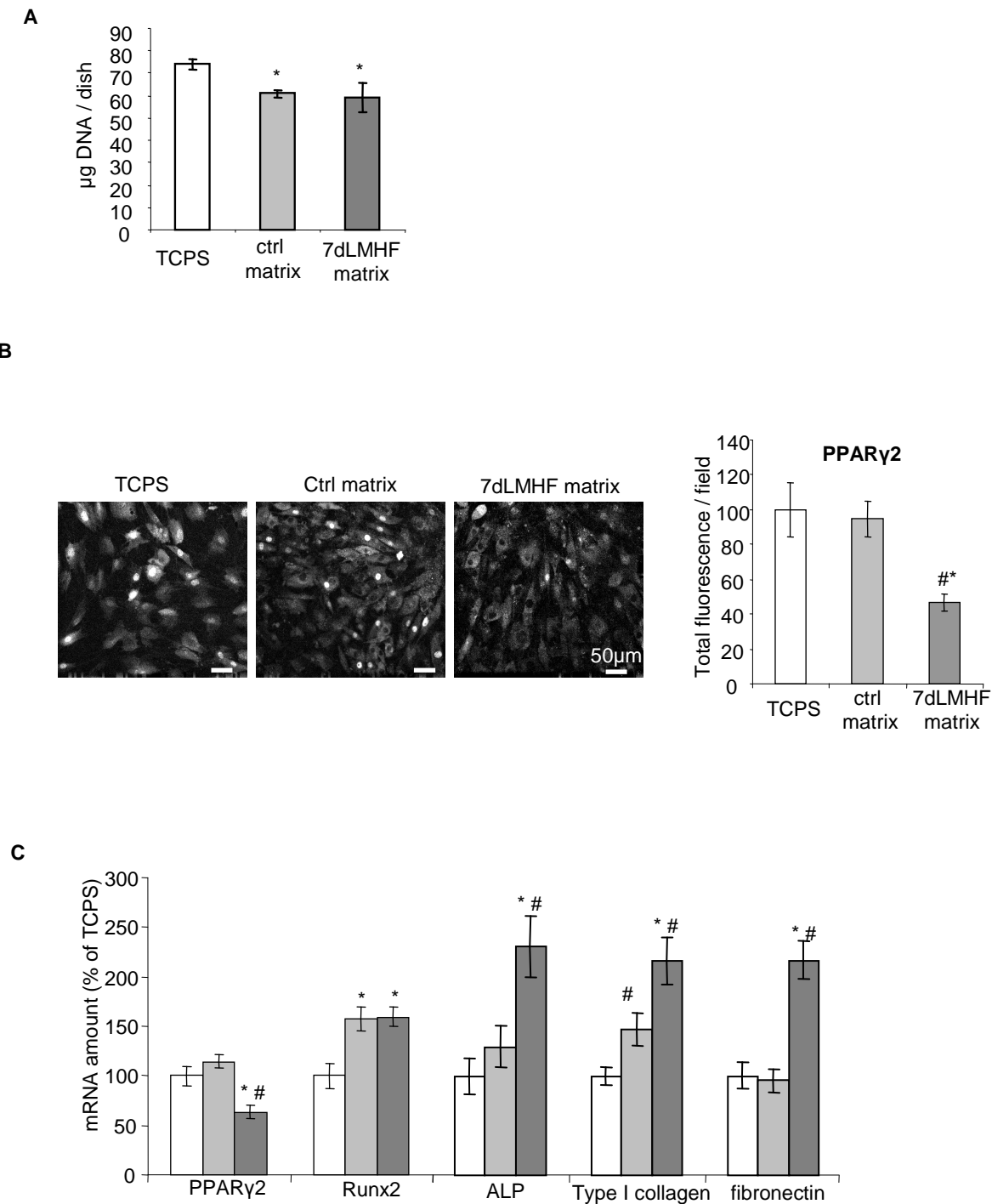


Figure 6: MSCs differentiation on matrix produced under LMHF

(A) DNA quantification in C3H10T1/2 cells cultured on TCPS (empty bars), ctrl matrix (bright grey bars) and 7 dLMHF matrix (dark grey bars) for 2 days in preculture medium followed by 5 days in PM. n=4 Mean \pm SEM.

(B) PPAR γ 2 staining and IF quantification in C3H10T1/2 cells cultured on TCPS (empty bars), ctrl matrix (bright grey bars) and 7 dLMHF matrix (dark grey bars) for 2 days in preculture medium followed by 5 days in PM (permissive medium). Analysis of 3 dishes with 10 fields per dish. Mean \pm SEM.

(C) mRNA levels in C3H10T1/2 cells cultured on TCPS (empty bars), ctrl matrix (bright grey bars) and 7 dLMHF matrix (dark grey bars) for 2 days in preculture medium followed by 5 days in PM. Values were normalized to cyclophilin mRNA level and expressed as a ratio to controls (Ctrl). p<0.05 * vs TCPS, # vs matrix ctrl n=5 Mean \pm SEM.

➤ Résultats complémentaires de l'article 2

Les BAHF fractionnées ont peu d'effets sur l'expression génique des protéines matricielles

Le temps de repos entre chaque stimulation mécanique est un des paramètres décrit comme influençant la réponse ostéoblastique à la contrainte (Robling, Burr et al. 2000). La durée totale de stimulation (20 minutes) a été fractionnée, le régime a été modifié de manière à appliquer 10 épisodes courts de 2 min avec un temps de repos de 60 min entre chaque épisode. Les augmentations d'expression génique des protéines matricielles sont plus faibles que celles observées lors d'une contrainte continue (voir article 2 et [Figure 38](#) ci-dessous), ce qui montre que les ostéoblastes sont moins réceptifs à la contrainte fractionnée mais aussi que leur réponse est modulable en fonction des paramètres de la contrainte mécanique.

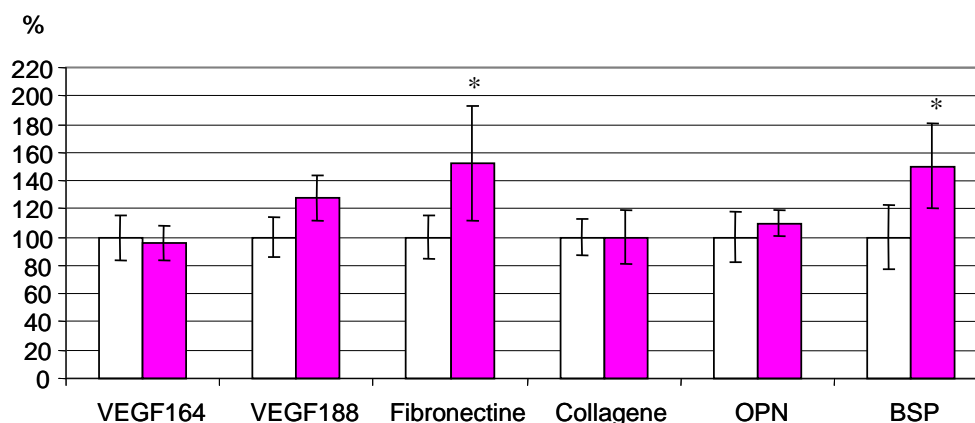


Figure 38: Expression génique des protéines matricielles normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm erreur type. $n = 4$; Témoin vs BAHF fractionnées $p < 0,05$.

Redistribution et augmentation des iNOS sous BAHF

Nous avons précédemment présenté des dosages de NO dans le milieu de culture montrant une augmentation de sa production lorsque les cellules sont soumises aux stimulations. Le NO est généré à partir de la L-Arginine par une NO synthase dont il existe trois isoformes eNOS, nNOS et iNOS ; toutes présentes dans les ostéoblastes. Nous avons réalisé un marquage IF afin de visualiser les iNOS des MC3T3-E1.

Des co-marquages (iNOS et appareil de Golgi) montrent que les iNOS ne sont pas situées dans l'appareil de Golgi (peu de colocalisation) mais à proximité de ce dernier ou dispersées dans le cytoplasme. Des données sur les macrophages décrivent une localisation similaire (Kolodziejska, Burns et al. 2005). Dans notre étude, on note une redistribution

spatiale des iNOS lorsque les cellules ont été stimulées mécaniquement durant 3 jours (épisode quotidien de 20min). Leur localisation, périnucléaire chez les témoins, devient cytoplasmique après stimulation avec un regroupement en « filaments ». D'autre part, les iNOS s'orientent du même côté que l'appareil de Golgi [Figure 39](#). L'orientation de l'appareil de Golgi dans les cellules stimulées témoigne d'une ré-orientation cellulaire prémigratoire. Cependant la migration cellulaire ne se ferait pas dans une direction privilégiée puisque l'orientation de l'appareil de Golgi est aléatoire d'une cellule à l'autre.

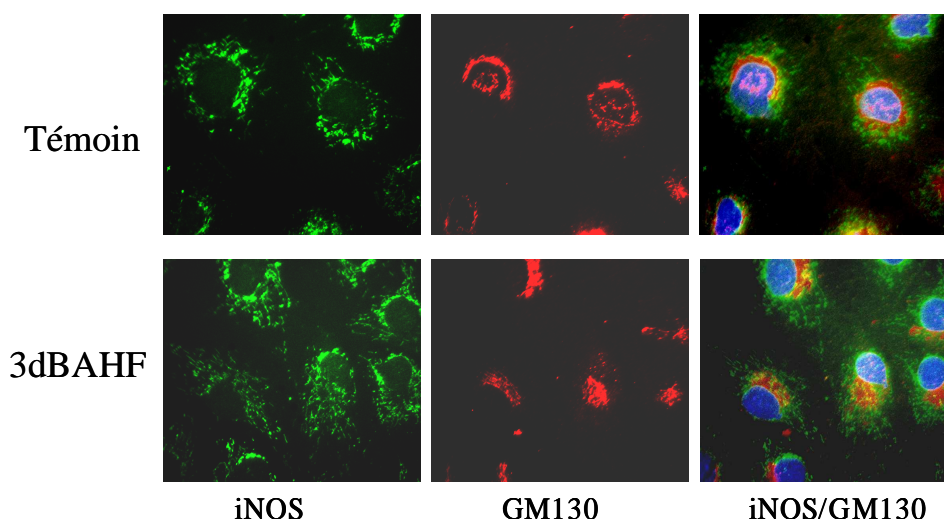


Figure 39 : Répartition des NO synthases (iNOS), de l'appareil de Golgi (GM130) et des noyaux (DAPI) après 3 épisodes de BAHF.

La quantification de la fluorescence totale ainsi que du nombre de noyaux par le logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) a permis d'évaluer si les iNOS sont induites par les BAHF. Après 3 épisodes de contrainte, les iNOS intracellulaires sont plus nombreuses [Figure 40](#) ce qui est cohérent avec l'augmentation de la sécrétion de NO dans le milieu de culture (Figure 1 de l'article).

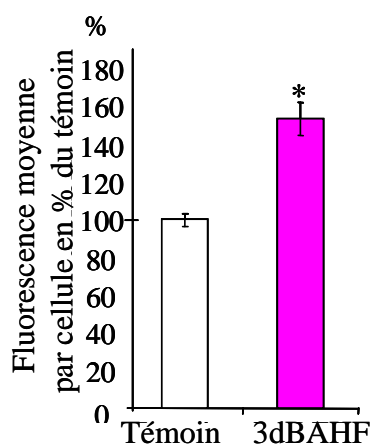


Figure 40 : Quantification de la fluorescence moyenne par cellule. Valeurs exprimées en pourcentage du témoin. n=3, 10 images par échantillons, p<0.05.

La iNOS est principalement soluble au niveau du cytosol. Comme son nom l'indique, elle est inductible, régulée de manière transcriptionnelle et indépendante du calcium. La relation contraintes mécaniques-production de NO par les ostéoblastes décrite par Bacabac (Bacabac 2004, 2006) montre une augmentation de NO très rapide (5 minutes après la contrainte mécanique) ce qui laisse supposer que ce sont les NOS constitutives (calcium dépendantes) qui entrent en jeu. Dans notre étude, nous n'observons pas une augmentation rapide de NO mais l'augmentation se manifeste de manière plus tardive, après trois jours de BAHF. Dans la littérature, il n'y a pas d'études montrant le lien entre contraintes mécaniques et augmentation des iNOS, par contre plusieurs publications montrent que les iNOS des préostéoblastes (MC3T3-E1) sont induites par des ultrasons (stimulations très hautes fréquences de l'ordre du MegaHertz) (Saito, Soshi et al. 2004; Tang, Lu et al. 2007; Hou, Lin et al. 2009). L'induction des iNOS pourrait ainsi être une des réponses caractéristiques des ostéoblastes soumis à des signaux hautes fréquences.

Pas de modification de l'expression génique et protéique du VEGF A sous BAHF

Les niveaux d'ARNm du VEGF A total et de ses deux types de récepteurs (Flt-1 : Fms-related tyrosine kinase, KDR : Kinase-insert-Domain-Receptor), mesurés 12 heures après le premier épisode de BAHF ne sont pas altérés [Figure 41A](#). Après 3 épisodes de BAHF la production du VEGF (dosage ELISA) n'est pas modifiée que ce soit dans la fraction insoluble ou soluble [Figure 41B](#).

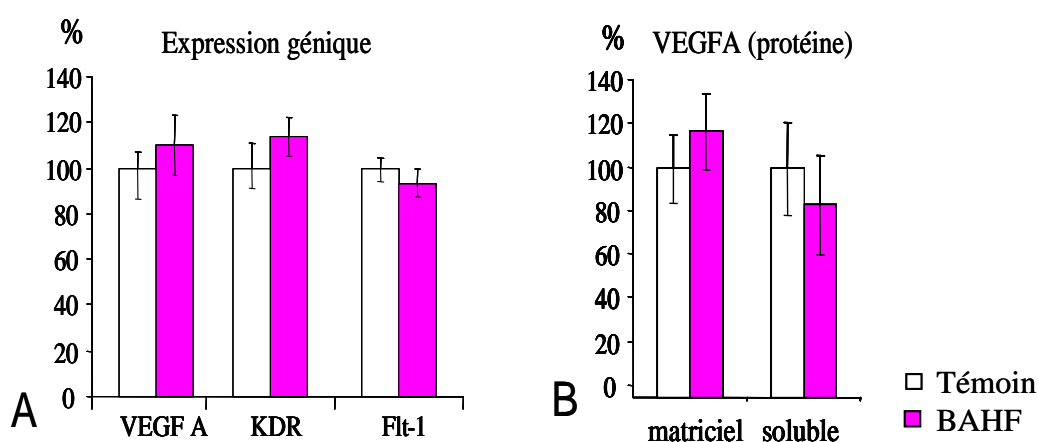


Figure 41 : (A).Expression génique du VEGFA et de ces récepteurs normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline. (B) Taux protéique de VEGFA mesuré sur lysats cellulaires (VEGF matriciel) ou milieu de culture (VEGF soluble). Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm erreur type. n = 5; Témoin vs 1 BAHF $p < 0,05$.

Dans ces résultats complémentaires, nous montrons que les BAHF n'affectent pas l'expression génique et protéique du VEGF. Ce facteur angiogénique comme d'autres facteurs de croissance a un rôle primordial lors de l'implantation de biomatériaux macroporeux 3D. Ainsi, pour améliorer la production des facteurs de croissance, et reprenant l'idée déjà développée dans le premier article, nous avons souhaité « enrichir » un stimulus (les BAHF) par l'ajout d'une autre stimulation.

V.2.2. Réponses cellulaires au champ électrique

➤Matériels et méthodes

a) Les dispositifs développés pour appliquer des champs électriques à des cellules en culture

Un champ électrique est défini par sa direction, son sens et sa valeur (ou amplitude). La valeur du champ électrique est exprimée en Volt par mètre (V/m), elle correspond à la différence de potentiel appliquée entre les deux électrodes divisée par la distance qui sépare ces mêmes électrodes ($E=V/d$ avec E : amplitude du champ électrique, V : différence de potentiel, d : distance entre les deux électrodes). Le champ électrique est directement relié au potentiel électrique V par la formule : $\vec{E} = -\overrightarrow{\text{grad}} V$. On dit que le champ dérive du potentiel par l'intermédiaire d'un gradient. Un champ électrique peut être créé entre deux électrodes dont la tension entre les deux est non nulle.

Les électrodes déposées directement sur la boîte de culture

Le premier dispositif correspond à un dépôt d'électrodes en métal conducteur directement sur le polystyrène de la boîte de culture. Ces électrodes sont reliées à un amplificateur (Treck, modèle 50/750) et à un générateur de signaux (Agilent 33220A) qui permettent d'appliquer une tension positive (alternative avec offset) aux bornes des électrodes de manière à maintenir le sens du champ électrique constant. Tout d'abord, nous avons tenté de

préparer des boîtes de culture avec des électrodes en or déposées par pulvérisation cathodique. C'est une méthode de dépôt de couche mince à partir de la condensation d'une vapeur métallique issue d'une source solide (cible en or) sur un substrat (boîte de Petri). Dans les boîtes traitées par pulvérisation cathodique les ostéoblastes ont une morphologie très allongée, les composants du cytosquelette (actine et tubuline) et la synthèse de matrice (fibronectine) présentent une organisation particulière (voir photos en annexe). Cette méthode de dépôt utilise un fort champ électrique, celui-ci modifie les charges électrostatiques de la boîte de Petri de manière non maîtrisée. D'autre part, les électrodes en or sont trop coûteuses pour être utilisées en grande série, nous avons donc recherché une autre méthode de dépôt.

Nous avons opté pour un vernis d'argent qui a permis de peindre plusieurs formes d'électrodes sur la boîte de culture avec l'avantage de pouvoir rester en conditions stériles (peinture et séchage sous la hotte).

Les électrodes en « demi lune » sous la boîte de Petri permettent d'obtenir un champ électrique parallèle à la culture cellulaire entre les deux électrodes [Figure 42](#).

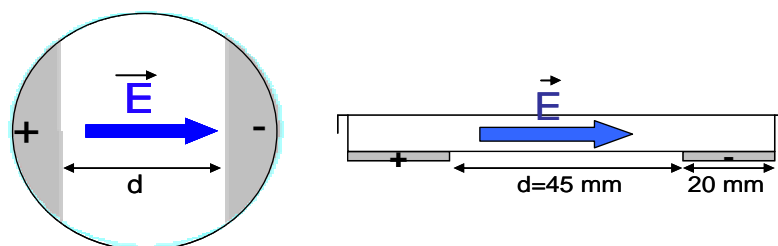
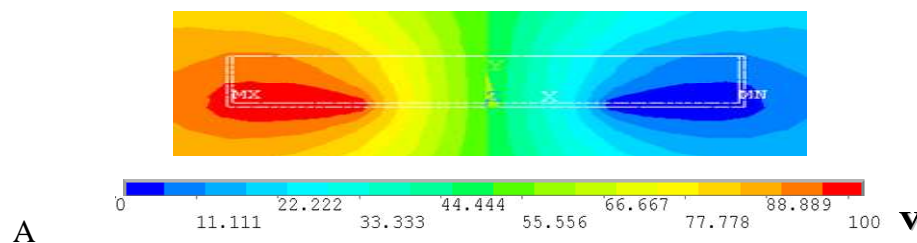


Figure 42 : Électrodes d'argent en « demi lune » : champ électrique parallèle à la culture ostéoblastique (vue de dessus et coupe transversale). d = distance entre les électrodes.

La modélisation de l'amplitude du champ électrique à un instant donné [Figure 43](#) montre qu'il est homogène pour les cellules se trouvant entre les deux électrodes.



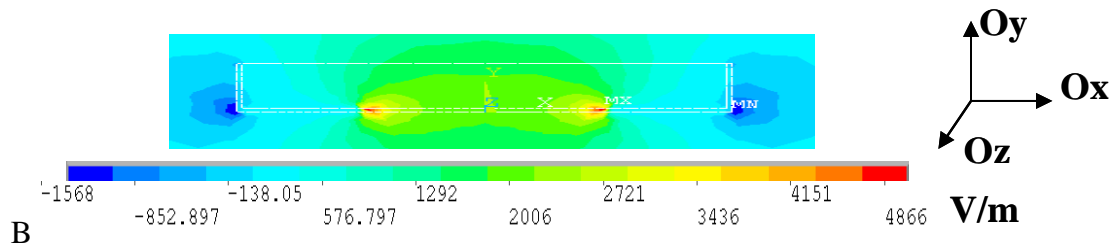


Figure 43 : Modélisation de la répartition des (A) potentiels sur chaque électrode et (B) de l'amplitude du champ électrique selon Ox.

Ce dispositif a l'avantage de maintenir la distance (d) entre les électrodes constante, d'après la formule " $E=V/d$ " et le résultat de la modélisation, le champ électrique est donc homogène dans la zone entre les électrodes. Cependant, les cellulesensemencées dans les deux zones en demie-lune (au dessus des électrodes) ne reçoivent pas de champ électrique. D'autre part, ce système n'est pas compatible avec l'application des BAHF : le buzzer ($\varnothing=50\text{mm}$) utilisé pour la contrainte mécanique toucherait les électrodes, ce dernier étant un bon conducteur, le champ électrique serait annulé.

Pour obtenir un champ électrique qui puisse être combiné aux BAHF, une autre forme d'électrodes a été développée. **Des électrodes en arc de cercle** suivant le périmètre de la boîte génèrent également un champ électrique parallèle à la culture cellulaire [Figure 44](#).

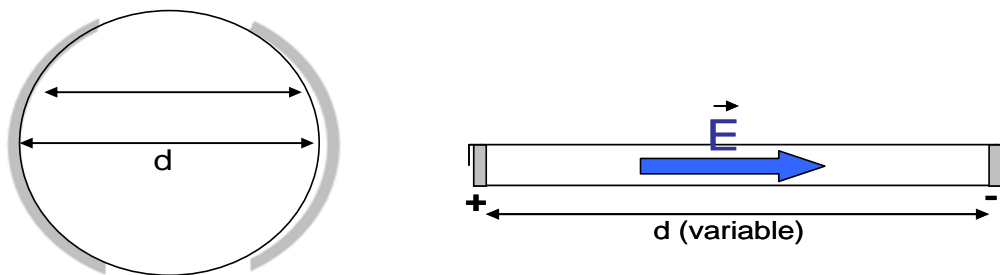


Figure 44 : Électrodes d'argent en « arc de cercle » sur les bords de la boîte de Petri: champ électrique parallèle à la culture ostéoblastique (vue de dessus et coupe transversale). d = distance entre les électrodes.

Ce dispositif est combinable avec l'application de BAHF mais la distance (d) entre les électrodes étant variable, le champ électrique n'est pas homogène : plus d est faible plus les cellules reçoivent un champ électrique important.

Le condensateur à plaques parallèles

Le deuxième dispositif utilisé pour appliquer un champ électrique aux cultures ostéoblastiques est un condensateur à plaques parallèles (France 3D scientifique U300400) [Figure 45](#). Ce condensateur est relié au mêmes amplificateur et générateur utilisés dans le premier dispositif.

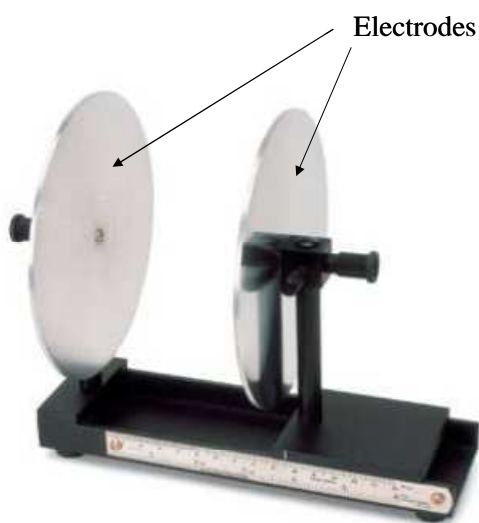


Figure 45 : Condensateur à plaques parallèles (France 3D scientifique U300400)

Quatres boîtes de pétri sont placées entre les deux électrodes (plaques parallèles). Grâce à une adaptation, les électrodes peuvent être disposées de deux manières différentes : horizontalement ou verticalement. Ainsi le champ électrique créé peut être perpendiculaire (\perp) ou parallèle (\parallel) à la culture ostéoblastique [Figure 46](#). Les boîtes de petri utilisées avec le champ électrique \perp sont identiques à celles employées pour créer les BAHF (boîtes rondes). Les boîtes de petri utilisées avec le champ électrique \parallel sont rectangulaires afin de garantir un champ homogène sur toute la culture cellulaire.

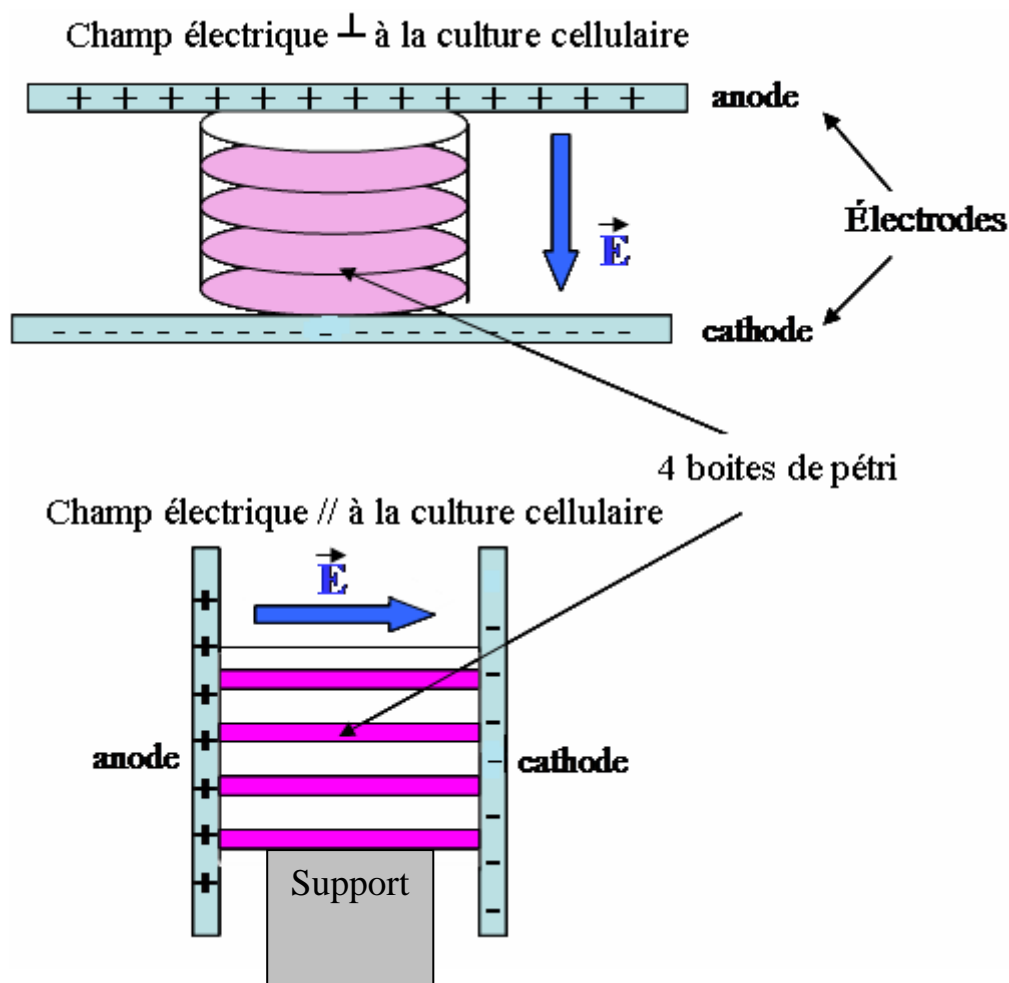


Figure 46 : Schéma du condensateur à plaques parallèles : deux directions de champ électrique possibles selon la disposition des électrodes

Modélisations et mesures expérimentales du champ électrique \perp

Le champ électrique \parallel , utilisant des boîtes rectangulaires non compatibles avec les BAHF, n'a pas été caractérisé. Le champ électrique \perp , plus intéressant pour notre objectif de combinaison, a été modélisé et mesuré expérimentalement. La tension appliquée aux électrodes correspond à une tension sinusoïdale (400Hz) de 300V avec un offset de 150V, la tension est donc toujours positive et varie entre 0 et 300V [Figure 48](#).

Des modélisations ont permis de déterminer, de manière qualitative, la répartition des potentiels sur chaque électrode, la direction, le sens et l'amplitude du champ électrique entre les deux électrodes à un instant donné [Figure 47](#). Les modélisations ont été réalisées en tenant compte des différentes interfaces entre les deux électrodes : polystyrène des boîtes de Petri, air et milieu de culture.

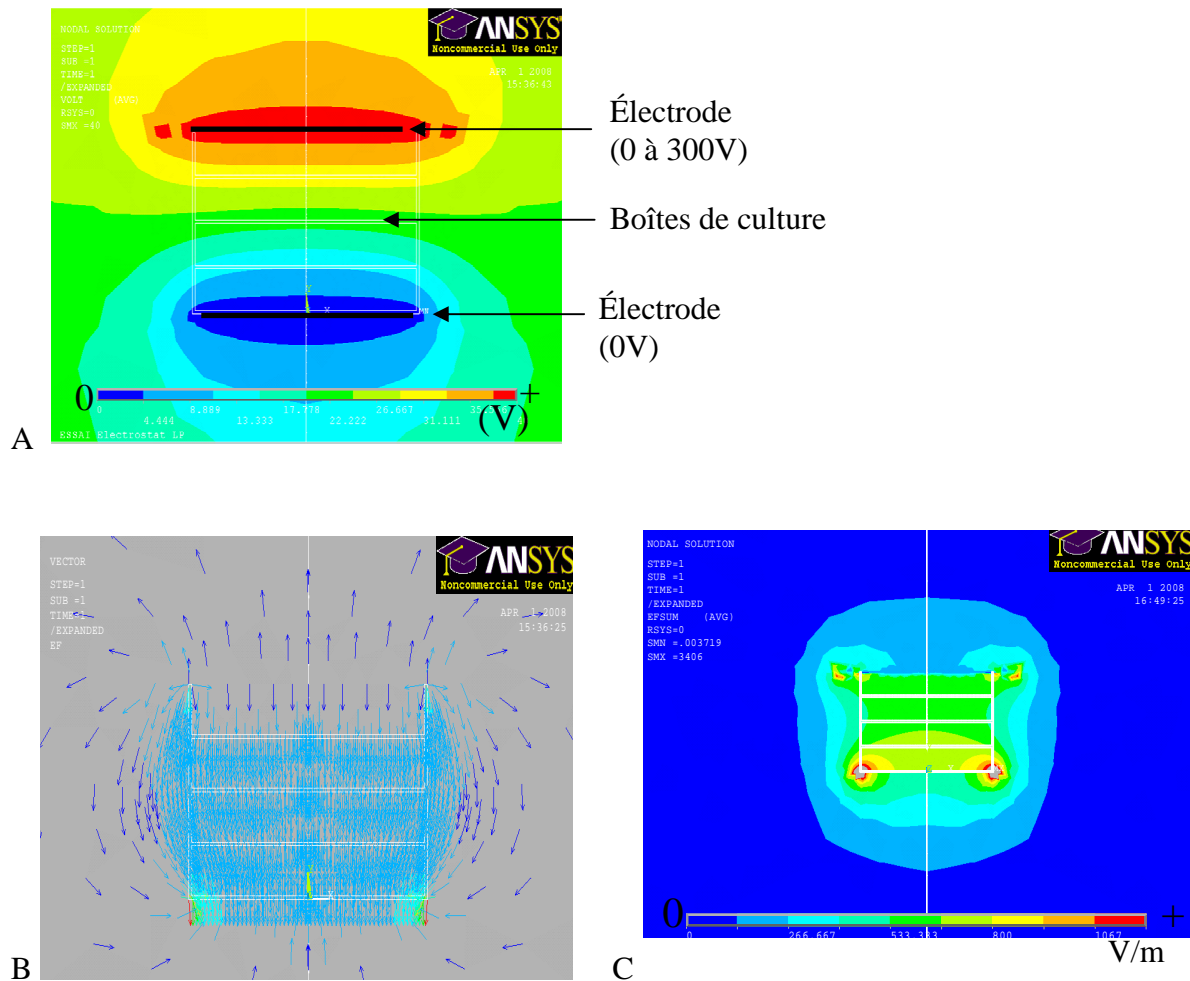


Figure 47 : Modélisation qualitative (A) des potentiels (B) des lignes de champ (les flèches bleu clair sont orientées de haut en bas) et (C) de la valeur du champ électrique perpendiculaire à la culture cellulaire.

La modélisation de la répartition des potentiels portés par les électrodes [Figure 47A](#) à un instant donné montre qu'il existe une différence de potentiel. Lors de l'application d'une tension sinusoïdale avec un offset (voir le paragraphe modalités de champ électrique), la cathode est maintenue à un potentiel de 0V alors que le potentiel de l'anode varie entre 0 et 300V.

La modélisation des lignes de champ [Figure 47B](#) montre que le champ électrique produit entre les deux électrodes est perpendiculaire aux cultures cellulaires. Le champ électrique rayonne autour du condensateur [Figure 47B](#), les cultures témoin ont donc été placées suffisamment loin du dispositif pour ne pas être influencées par ces lignes de champ rayonnantes.

L'amplitude du champ électrique [Figure 47C](#) n'est pas totalement homogène entre les deux électrodes étant donné la disposition des diverses interfaces entre les électrodes.

Des mesures expérimentales ont complété ces modélisations afin de quantifier l'amplitude du champ électrique et la tension au niveau de chaque boîte. L'appareil de mesure « ME 3030B Digitaler Electromog Analyser » permet d'effectuer des mesures de champ électrique de 1 à 1999 V/m (résolution : 1V/m, précision $\pm 2\%$) pour des fréquences allant de 16 à 2000 Hz. Nous avons appliqué une tension sinusoïdale de 300V (avec un offset de 150V) à 400Hz. L'appareil a été placé entre les deux électrodes sans boîte de culture ou bien avec une boîte de culture de part et d'autre. Dans les deux cas, l'amplitude du champ électrique mesurée est en moyenne de l'ordre de 25 V/cm (valeur efficace). Cette valeur expérimentale est proche de la valeur théorique calculée par la formule $E=V/(d*\sqrt{2})$. $E= 300/(8*\sqrt{2})=26,5V/cm$.

De par l'encombrement de l'appareillage, il n'est pas possible de mesurer le champ électrique au niveau de chaque boîte.

Comme nous n'avons pas pu vérifier l'homogénéité du champ électrique, les boîtes ont été numérotées lors de nos expériences afin d'identifier leur position dans le dispositif. Bien que le condensateur à plaques parallèles présente l'inconvénient de délivrer un champ électrique \perp non homogène sur les 4 cultures cellulaires, ce dispositif sera choisi parce qu'il est compatible avec les boîtes de petri rondes utilisées pour les sollicitations BAHF.

b) Modalités des champs électriques testées sur des cultures cellulaires: direction, sens, fréquence, amplitude, durée d'application

Avec le condensateur à plaques parallèles, la direction du champ peut être parallèle ou perpendiculaire à la culture ostéoblastique selon l'orientation des électrodes. La tension aux bornes des électrodes était sinusoïdale avec un maximum de 300V et un offset de 150V [Figure 48](#) ce qui permet de conserver le sens du champ. La fréquence choisie est de 400Hz afin de correspondre à la fréquence utilisée pour les BAHF. L'amplitude du champ est de l'ordre de 25V/cm en valeur efficace.

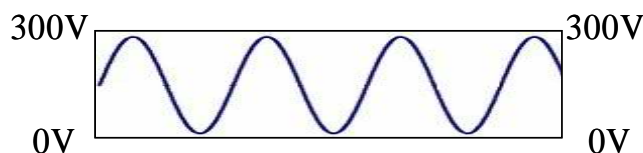


Figure 48 : Tension sinusoïdale avec offset

Avec les électrodes d'argent en demi lune, la direction du champ est parallèle à la culture ostéoblastique. La tension appliquée correspond au signal sinusoïdal avec offset [Figure](#)

48. La fréquence était de 400Hz et l'amplitude théorique de l'ordre de 35 V/cm en valeur efficace.

Avec les électrodes d'argent en arc de cercle, la direction du champ est parallèle à la culture ostéoblastique. La tension sinusoïdale est appliquée sans offset, ce qui fait varier le sens du champ. Deux types de fréquence ont été testées : les très hautes fréquences (100kHz) et les basses fréquences (0,1Hz). Ces deux types de fréquences sont comparés car à très haute fréquence les molécules ioniques du milieu de culture n'ont pas le temps de se polariser alors qu'à très basse fréquence les ions pourraient se polariser.

L'amplitude théorique du champ varie de 25 à 35 V/cm en valeur efficace.

La durée d'application des champs électriques est de 14 heures par jour pendant 1, 3 ou 5 jours.

c) Les cultures cellulaires

Les cellules ostéoblastiques murines MC3T3-E1 sous clone 4 (MC-4) (lignée immortalisée) sont cultivées dans un milieu α MEM (alpha modified Eagle's medium) complet (10% de SVF, 2 mM de l-Glutamine, et des antibiotiques (50 U/ml de pénicilline et 50 μ g/ml de streptomycine)). Dans les conditions expérimentales, ce milieu de culture est supplémenté extemporanément avec 50 μ g/ml d'ascorbate phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) et renouvelé tous les deux jours. Les MC3T3-E1 sont utilisées jusqu'au passage 15. Elles sontensemencées à une densité de 8 000 cellules/cm², 24h avant le début de la stimulation électrique.

Les cellules ostéoblastiques primaires humaines sont issues d'un calcaneum (os du tarse) humain (enfant de 14 ans). Elles sont cultivées dans du DMEM/HAM's F12 complet supplémenté avec 2% d'Ultroser et extemporanément avec 50 μ g/ml d'ascorbate phosphate. Elles sont utilisées entre les passages 2 et 4 où elles présentent un phénotype ostéoblastique (PAL positive). Elles sontensemencées à une densité d'environ 1000 cellules/cm², 24h avant le début de la stimulation électrique.

Les cellules de la lignée stromale murine C3H10T1/2 (clone-8; American Type Culture Collection, LGC Promochem, Molsheim, France) sontensemencées à une densité de 5000 cellules/cm² deux jours avant le début de la mise sous champ électrique. Elles sont utilisées du passage 10 au passage 15. Pendant les deux jours de préculture avant le début des conditions expérimentales, les cellules sont dans un milieu standard (α MEM complet), sans agent de différenciation cellulaire. A J0, le milieu est supplémenté en ascorbate phosphate 10⁻⁷

10^{-8} M, Dexaméthasone 10^{-8} M (Dex), Insuline 1%, Isobutyl-methylxanthine 10^{-5} M (IBMX), acide rétinoïque tout-trans (AR) 10^{-8} M, β -glycérophosphate 10^{-6} M. Ce milieu est appelé milieu permissif ; il permet la différenciation cellulaire soit vers la voie adipogénique soit vers la voie ostéoblastique. Il est changé tous les deux jours. La dexaméthasone seule suffit à initier la différenciation adipocytaire et la présence d'AR suffit à initier la différenciation ostéoblastique (à 10^{-8} M). De plus, l'AR inhibe la différenciation adipocytaire à cette concentration (10^{-8} M). A des concentrations plus élevées, l'AR est connu pour stimuler également la différenciation adipocytaire, cependant il se révèle toxique pour les cellules. Un milieu supplémenté en AR et Dex induit une différenciation cellulaire vers les deux voies, cependant la différenciation adipocytaire est réduite par rapport à l'adipogénèse observée en présence de Dex seule. L'ajout d'Insuline et IBMX compense cette réduction du nombre d'adipocytes (Thèse Valentin DAVID 2006).

d) Paramètres cellulaires

Prolifération et viabilité

Les concentrations d'ADN double brin ont été estimées par fluorimétrie en utilisant le kit PicoGreen® quantification d'ADN (Invitrogen SARL, Molecular Probes, Cergy Pontoise, France). Les réactifs (dsDNA reagent, TE buffer: 200mM Tris-HCl, 20mM EDTA, pH7.5 and lambda DNA standard) ont été utilisés selon le protocole du kit. Les échantillons sont excités à 485nm et leur émission est mesurée 538 nm par un fluorimètre (Fluoroscanner Ascent, Thermo Labsystems).

Le test Alamar Blue® (Biosource, USA) est conçu pour mesurer quantitativement la prolifération et la viabilité cellulaire. Ce composé comprend un indicateur colorimétrique sensible à l'activité métabolique cellulaire. L'Alamar Blue®, n'est pas un toxique cellulaire et le test ne nécessite pas la lyse des cellules, permettant ainsi de suivre l'évolution du signal de manière cinétique. Des cellules en bonne santé et/ou en prolifération produisent des composés réducteurs tels que FADH₂, NADH, NADPH et ont une activité cytochromique préservée contribuant à réduire l'Alamar Blue®. Par contre, des cellules atteintes par un stimulus cytotoxique ne réduisent pas l'Alamar Blue® et produisent des composés oxydants. La mesure densitométrique intervient 90 minutes (à 37°C) après l'adjonction du marqueur (10% d'Alamar Blue® dans un milieu sans rouge de phénol). Le pourcentage de réduction du milieu est déterminé par la mesure de l'absorbance à 570 (composé réduit) et 600 nm (composé oxydé) par un spectrophotomètre (*Multiskan Spectrum Thermo Scientific*).

Le nombre de cellules vivantes corrèle avec le pourcentage de réduction obtenu.

L'expression génique

PCR en temps réel

La technique de PCR en temps réel (décrite dans l'article 2) a permis de quantifier l'expression des gènes de certaines protéines matricielles, de marqueurs de différenciation et de facteurs angiogéniques. Les amorces utilisées sont données dans les tableaux 2 et 3. L'expression des gènes est normalisée par la cyclophiline.

Amorces humaines	sens	antisens	Longueur du produit	Source
Cyclophilin	5' AGCTGTTTGC AGACAAAGTT 3'	5'CCAAAGACCA CATGCTTGCC 3'	322pb	AF022115
VEGF189	5'CCTGGAGCGT TCCCTGTGGG 3'	5'CTCCTGCCCCG GCTCACCGCC 3'	176pb	M003376
VEGF121	5'GGACATCTTC CAGGAGTACC3	5'GGCTTGTCAC ATTTTCTTG3',	258pb	NM003376
VEGF 165	5'CAAGAAAATC CCTGTGGGC3'	5'CTCCTGCCCCG GCTCACCGCC3'	175pb	NM003376
Fibronectine I	5'GGAGAACCAA GACTGAGACG 3'	5'CTGTGATGGT GTAGCTTCTG 3'	114pb	NM212482
Collagen I	5'TGACCTCAAG ATGTGCCACT 3'	5'ACCAGACATG CCTCTTGTC 3'	197pb	NM000088

Tableau 2 : Séquence des amorces utilisées pour la PCR en temps réel pour les ostéoblastes primaires humains

Amorces murines	sens	antisens	Longueur du produit	Source
Cyclophiline	5'GGTGACTTTAC ACGCCATAATG 3'	5'GGCTTCCACAA TGTTTCATGCC 3'	231pb	NM008907
VEGF A (total)	5'GTGCGGCACC ACCCAGAACTA 3'	5'CTGGTCTCGG AGCTGGGAGTA 3'	217pb	NM010233
Fibronectine I	5'CACCCTCAAG AGCCTGAGTC 3'	5'TTAGGCGCAG GAAGGTCAGC3'	374pb	NM007742
Collagène I	5'CCCGGTGAAA GTGACTGATTC3'	5'ATGGCTTTCA TTGGAATTGC3'	193pb	NM009263
Ostéopontine	5'AAAGTGAAGG AAAGCGACGA3'	5'GTTCTTCTG CACCTGCTTC3'	215pb	NM008318
PPARgamma	5'GAAATTACCATG GTTGACACAGAG3'	5'GTGAATGGAAT GTCTTCATAGTG3'	170pb	NM011146
Runx2	5'GAGGCCGCC GCACGACAA3'	5'CTCCGGCCC ACAAATCTCA3'	294pb	NM009820
PAL	5'CCAACTCTTTT GTGCCAGAGA3'	5'GGCTACATTGG TGTTGAGCTTTT3'	110PB	NM007431

Tableau 3 : Séquence des amorces utilisées pour la PCR en temps réel pour les ostéoblastes d'origine murine

Microarray

Pour réaliser le microarray, nous avons utilisé le kit « RT2 first strand kit C03 » pour la reverse transcription et le kit RT2 SYBR Green PCR Master Mix PA-012-12 pour la PCR. Les plaques 96 puits « RT2 Profiler PCR Assay Human Angiogenesis PAHS-024C-12 » commercialisée par Superarray contiennent les amorces de 84 gènes impliqués dans la régulation de l'angiogénèse et des amorces de contrôles (qualité de l'ADNc, contrôle de la RT et 5 gènes de ménage). Cet array inclut des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des cytokines, des molécules d'adhésion et matricielles, des protéases et leurs inhibiteurs ainsi que tous les facteurs de transcription impliqués dans le développement de nouveaux vaisseaux. La liste des amorces et le plan de la plaque multipuits est fournie en annexe.

La synthèse et l'activité protéique

Dosages ELISA : VEGF et OPN

24 heures après la fin de la stimulation électrique, les cellules sont lysées dans un tampon de lyse contenant du PBS avec 0.5% de Nonidet 40 et 1% d'un cocktail d'inhibition de protéases (Sigma, St. Quentin fallavier, France) et le milieu de culture est récolté. Des dosages ELISA sont réalisés pour quantifier l'OPN et le VEGF présents dans les lysats cellulaires (matriciels) et dans le milieu de culture (solubles).

Le VEGF humain est dosé grâce au kit ELISA “*VEGF-human A, AbCys*” et le VEGF murin avec le kit “*VEGF-murine A, AbCys*” suivant les protocoles fournis. L'OPN murine est dosée avec le kit “*DuoSet mouse Osteopontin ELISA Development System (RD systems)*” suivant les instructions du fabricant. Chaque échantillon est quantifié en duplicate. Les valeurs sont corrigées avec du milieu de culture ou du tampon de lyse sans cellule, elles sont ensuite normalisées par les protéines totales dosées dans le lysat cellulaire par le kit BCA Protein Assay Kit (Interchim, Pierce).

Dosage de l'activité PAL

La mesure de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline est réalisée grâce à la réaction à 37°C avec son substrat spécifique : le para-Nitrophenyl-phosphate (pNPP). Le dosage est réalisé en ajoutant 200 µL de substrat à 40 µL de lysat cellulaire. La réaction colorimétrique est suivie par mesure de la densité optique pour une longueur d'onde de 415nm. L'activité enzymatique de la phosphatase alcaline est exprimée en nmol de substrat/min/unité

de volume. Après dosage des protéines totales dans le lysat cellulaire (*kit BCA Protein Assay Kit, Interchim, Pierce*), les résultats sont exprimés en nmol de substrat/min/ μ g de protéines

e) Test de « lésion » : migration cellulaire

La migration cellulaire collective dans laquelle les cellules maintiennent des contacts cellule-cellule, est un mécanisme fondamental au cours du développement embryonnaire mais aussi chez l'adulte lors des phénomènes de cicatrisation de plaies. Ce phénomène de migration est couramment étudié dans un test dit de « lésion » [Figure 49](#). Une bande de cellules de largeur constante est arrachée sur une monocouche cellulaire confluente avec une pointe de pipette. Un rinçage au PBS permet d'éliminer les cellules décollées. Les cellules migrent alors pour combler la « blessure ». Des images sont acquises au cours du temps à 0h et à 36h après la lésion.

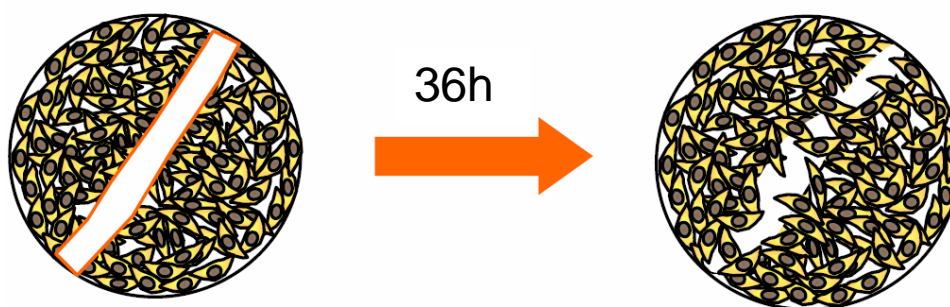


Figure 49 : Test dit de « lésion » pour étudier la migration cellulaire

Dans notre protocole, deux types de lésions ont été réalisées des lésions parallèles ou perpendiculaires au champ électrique // à la surface de la culture [Figure 50](#).

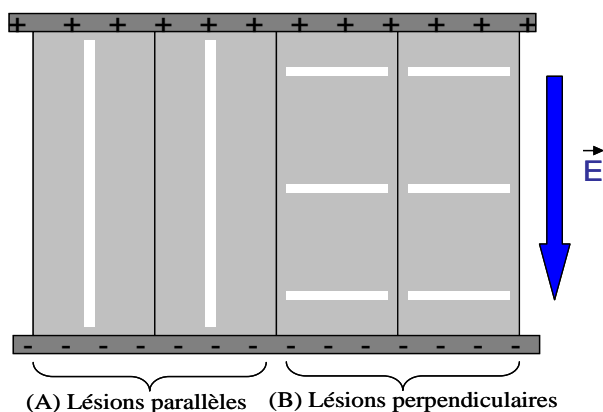


Figure 50 : Lésions parallèles ou perpendiculaires au champ électrique // à la surface de la culture

Pour une meilleure visualisation les cellules sont marquées à la calcéine (*Calcein AM, Molecular Probes*), diluée à 1µM dans du PBS, juste avant l'acquisition d'images. La calcéine est un marqueur cellulaire vital, elle n'affecte pas la viabilité cellulaire à faible concentration. Les photos sont prises par un microscope à fluorescence (*DMRB, Leica, Bensheim, Germany*) et imagées par une caméra (Roper Scientific CoolSnap α) utilisant le logiciel Meta Imaging serie 4.6.6.. L'aire de la lésion est quantifiée grâce au logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

➤Résultats : Réponses des cellules en culture au champ électrique

a) Screening des effets des diverses modalités de champ électrique sur les MC3T3-E1

Les diverses modalités de champ électrique décrites dans le paragraphe « matériel et méthodes » ont été appliquées sur les MC3T3-E1. Les analyses ont porté sur les protéines matricielles, le VEGF (ARNm ou/et protéines), le cytosquelette d'actine et la migration cellulaire. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous.


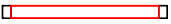

Type de champ	PCR 1 épisode	PCR 3 épisodes	ELISA OPN 3 épisodes	ELISA VEGF 3 épisodes	IF Actine, Fn	Migration
Champ \perp 400Hz (condensateur)	Fn + 40% * ColI = BSP + 50% * OPN = VEGFA =	Fn = ColI = BSP + 50% ** OPN = VEGFA =	OPN mat + 40% ** OPN sol + 20% **	VEGF matriciel = VEGF soluble =	Actine =	
Champ // 400Hz (condensateur)	Fn = ColI = BSP = OPN = VEGFA =	Fn + 50% ** ColI = BSP = OPN = VEGFA =	OPN mat = OPN sol =	VEGF matriciel = VEGF soluble + 40% *	Actine = Fn =	Test de lésion (voir résultats ci dessous)
Champ // 400Hz 			OPN matricielle = OPN soluble =	VEGF matriciel = VEGF soluble =		
Champ // 100KHz 			OPN matricielle = OPN soluble =	VEGF matriciel = VEGF soluble =		
Champ // 0,1Hz 			OPN matricielle = OPN soluble =	VEGF matriciel = VEGF soluble + 40% *		

Tableau : Récapitulatif des effets des différents types de champs électriques sur les MC3T3-E1. 1 épisode = 14 heures de champ par jour. n= 4 à 6 **résultats significatifs avec $p < 0.05$, * résultats avec une tendance $p < 0,1$

Le champ électrique perpendiculaire (400Hz) à la culture ostéoblastique affecte deux protéines matricielles de la famille des SIBLINGS : l'OPN et la BSP. Le niveau d'expression génique de la BSP a tendance à augmenter dès le premier épisode de champ électrique et il devient significatif après 3 épisodes. Le niveau d'ARNm de l'OPN n'est pas affecté après 1 ou 3 épisodes de champ électrique (8h post stimulation), en revanche on observe une augmentation de la synthèse protéique. Une étude cinétique post-stimulation serait nécessaire pour cibler la phase d'augmentation de l'ARNm de l'OPN.

Le champ électrique parallèle à la culture ostéoblastique (condensateur, 400Hz) augmente l'ARNm de la fibronectine après 3 épisodes de stimulation. Cependant, cette augmentation ne semble pas être traduite au niveau protéique : les marquages IF ne montrent pas de différences significatives au niveau de l'organisation du réseau de fibronectine. Du point de vue quantitatif, les marquages IF ne permettent pas d'observer de manière rigoureuse une augmentation de la production de fibronectine.

Les champs électriques créés par les électrodes d'argent n'ont pas d'effet sur la

synthèse protéique de l'OPN et du VEGF.

Afin d'observer l'influence du champ sur la migration des MC3T3-E1, un test de lésion a été réalisé avec un champ électrique // à la culture ostéoblastique (condensateur, 400Hz). Deux types de lésions ont été étudiées : les lésions parallèles à la direction du champ et les lésions perpendiculaires à la direction du champ [Figure 51](#), [Figure 52](#).

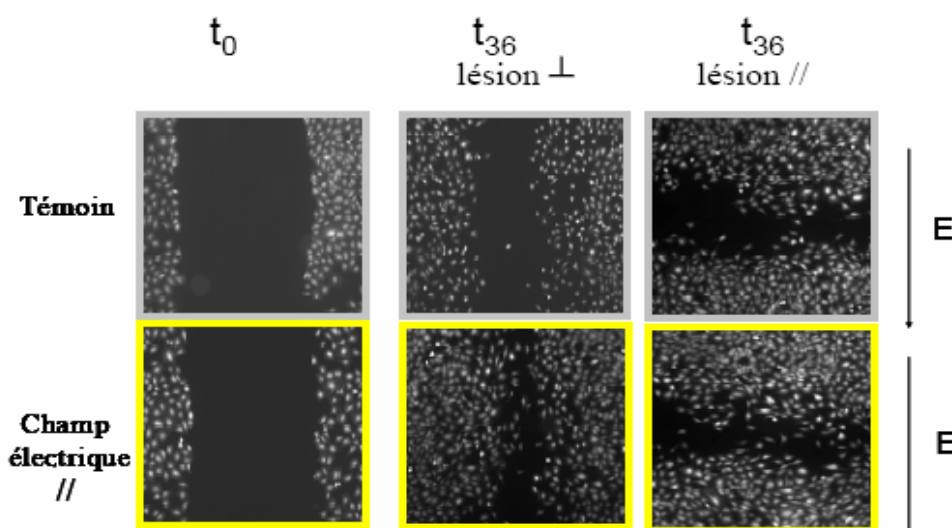


Figure 51 : Lésion parallèle (A) ou perpendiculaire (B) à la direction du champ électrique dans des cultures témoins ou soumises au champ électrique parallèle (condensateur 400Hz). Photographies (X50) réalisées à t0 ou t36 heures après la lésion.

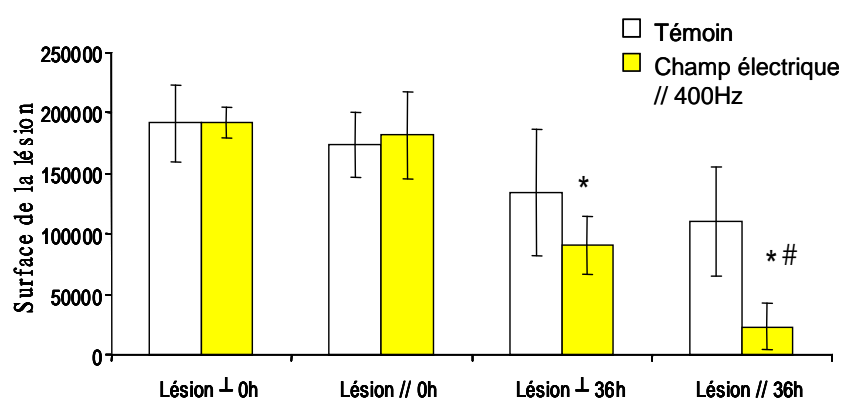


Figure 52: Surface de la lésion parallèle à la direction du champ (//) ou perpendiculaire à la direction du champ électrique dans des cultures témoins ou soumises au champ électrique parallèle (condensateur 400Hz). Surface quantifiée 0 heure ou 36 heures après la lésion. Moyenne \pm écart type n= 4, 20 images par lésion p<0.05 *significatif par rapport à la lésion témoin, # significatif par rapport à la lésion \perp 36 heure après l'application du champ électrique.

Sous champ électrique la lésion se referme plus rapidement ce qui signifie que la migration cellulaire est plus active. D'autre part la migration est plus efficace lorsque la lésion est parallèle au champ c'est-à-dire lorsque les cellules migrent perpendiculairement à la

direction du champ électrique. Ce résultat est cohérent avec les observations de Curtze (Curtze, Dembo et al. 2004). Il a montré un allongement et un réalignement des cellules (ostéoblastes primaires bovin et MG-63) perpendiculairement à un champ électrique continu (10V/cm) dès 3 heures de stimulation.

L'effet du champ électrique // le plus marquant sur les MC3T3-E1 concerne la stimulation de leur migration. Nous avons donc voulu vérifier si on retrouvait ce même effet sur les cellules primaires humaines. Alors que nous obtenions une augmentation de la migration cellulaire avec les MC3T3-E1, ce résultat n'a pas été confirmé sur les ostéoblastes primaires humains. Les réponses ostéoblastiques au champ électrique // semblent donc dépendantes du type cellulaire utilisé.

Ainsi, les résultats résumés dans le tableau ne permettent pas de dégager d'effets marquants du champ électrique sur les ARNm ou sur la synthèse de protéines, et ce, quelques soient les modalités du champ électrique. Cependant, nous notons que la plupart des réponses cellulaires sont obtenues avec la modalité de stimulation correspondant au champ électrique \perp à 400Hz généré par le condensateur.

D'autre part, dans les expériences de migration, nous n'avons pas pu reproduire les effets pro-migratoire du champ électrique // sur les différents types cellulaires. De ce fait, nous avons éliminé cette modalité de notre protocole. Nous nous sommes donc focalisés sur le champ électrique \perp compatible avec les BAHF.

b) Réponses des cultures cellulaires au champ électrique perpendiculaire

La prolifération

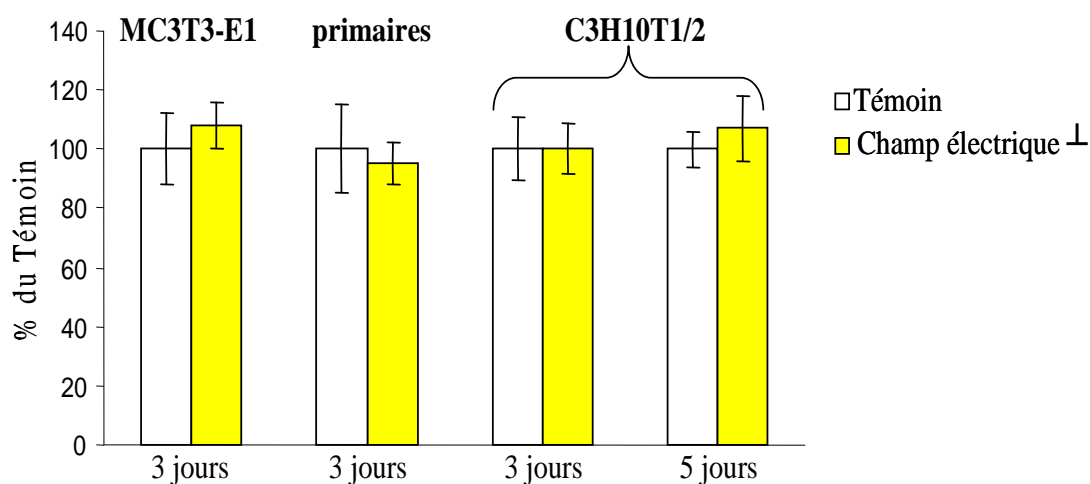


Figure 53 : Prolifération cellulaire des MC3T3-E1, osteoblastes primaires et C3H10T1/2. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs Témoin à 3 jours ou 5 jours de culture, en moyenne \pm écart type. n = 4; Témoin vs Champ électrique \perp p<0,05.

Le champ électrique appliqué 14 heures par jour pendant 3 jours n'affecte pas la prolifération des MC3T3-E1, ces résultats sont confirmés sur des cultures primaires humaines et sur les C3H10T1/2 [Figure 53](#).

Le VEGF

Les ARNm ont été extraits 8h après un unique épisode de champ électrique. La quantification du VEGF au niveau protéique est effectuée 24h après le troisième épisode de champ électrique afin d'avoir suffisamment de protéine à doser.

Réponses des MC3T3-E1

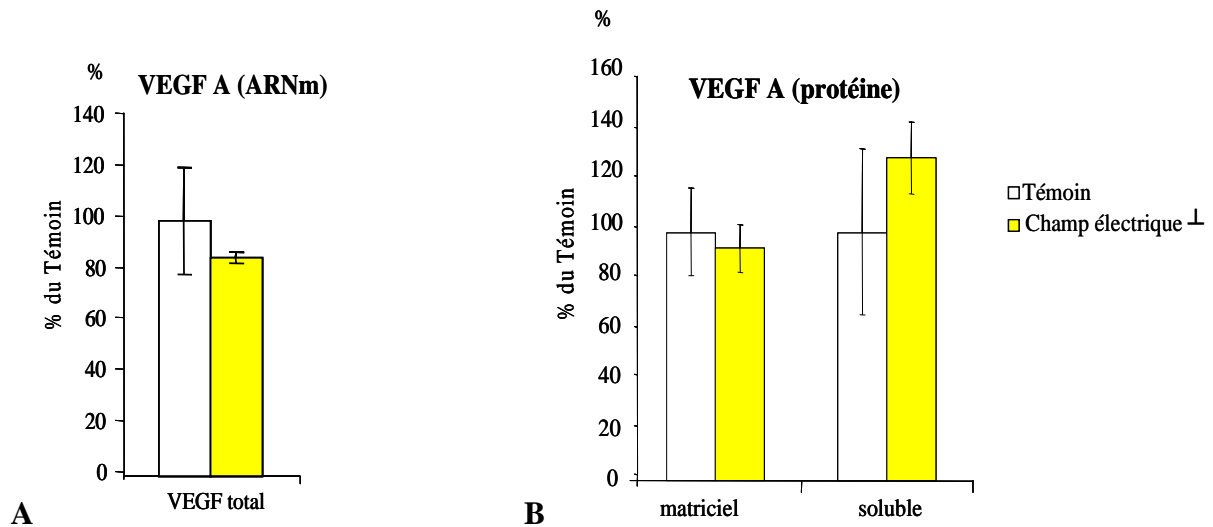


Figure 54 : Expression génique du VEGF normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline (A). Taux protéique de VEGFA mesuré sur lysats cellulaires (VEGF matriciel) ou milieu de culture (VEGF soluble) (B). Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm écart type. $n = 4$; Témoin vs champ électrique $p < 0,05$.

Le champ électrique n'a pas d'effet sur l'expression du VEGF total ni sur la synthèse protéique des VEGF matriciels et solubles [Figure 54](#).

Réponses des ostéoblastes primaires

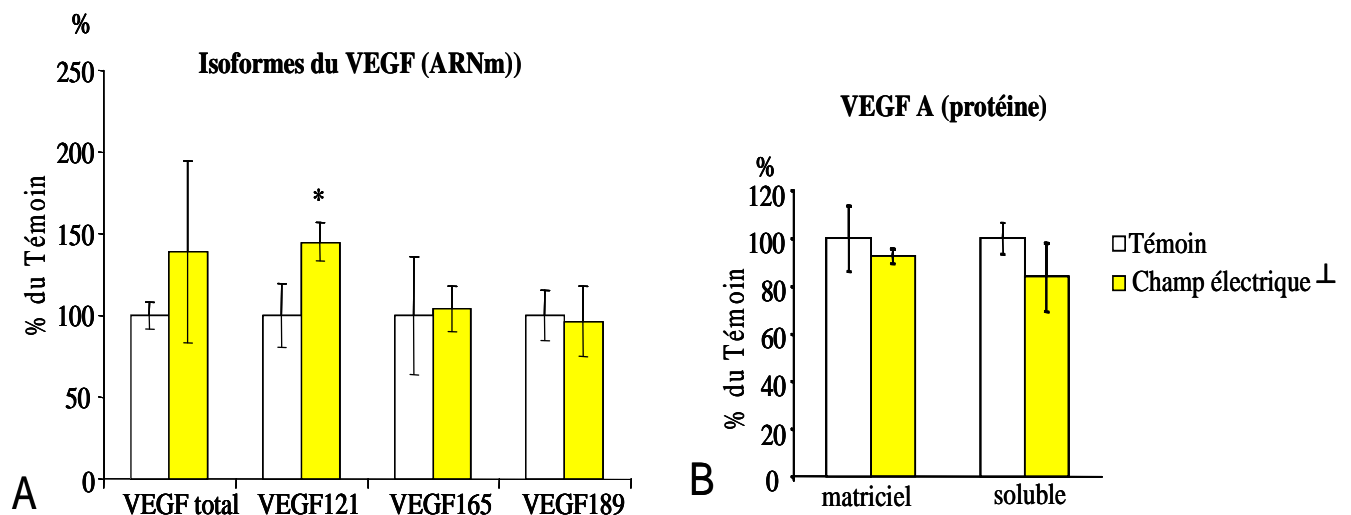


Figure 55 : Expression génique des isoformes du VEGF normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline (A). Taux protéique de VEGFA mesuré sur lysats cellulaires (VEGF matriciel) ou milieu de culture (VEGF soluble) (B). Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm écart type. $n = 4$; Témoin vs champ électrique $p < 0,05$.

Seule l'isoforme soluble du VEGF (121) est augmentée par un épisode de champ électrique. La synthèse protéique de VEGF soluble ou matriciel n'est pas affectée par le champ électrique [Figure 55](#). Le milieu de culture contient toutes isoformes solubles du VEGF (121 et 165), le dosage ELISA ne permet donc pas d'évaluer la part de variation de chacune des isoformes.

Ainsi, le champ électrique ne semble pas affecter ce facteur angiogénique que se soit sous la forme matricielle ou la forme soluble de la protéine.

D'après les résultats obtenus sur les MC3T3-E1 et les ostéoblastes primaires, les effets du champ électrique sur le facteur angiogénique ne sont pas assez probants. A cette étape, et avant d'aborder les études sur l'action conjuguée des deux stimulations, nous avons besoin de nous assurer que les cellules sont sensibles au champ électrique \perp , nous avons donc choisi un autre modèle cellulaire : les C3H10T1/2. Les réponses sont plus faciles à caractériser avec ce modèle cellulaire qui présente l'intérêt de ne pas être engagé dans la voie ostéoblastique.

c) Réponse des cellules stromales pluripotentes au champ électrique \perp

La différenciation ostéoblastique ou adipogénique

Les marqueurs de différenciation ont été étudiés après 2 jours de préculture et 5 jours de culture en milieu permissif pendant lesquels les cellules ont été soumises à 5 épisodes de champ électrique.

Expression génique de PPAR γ 2 et Runx2

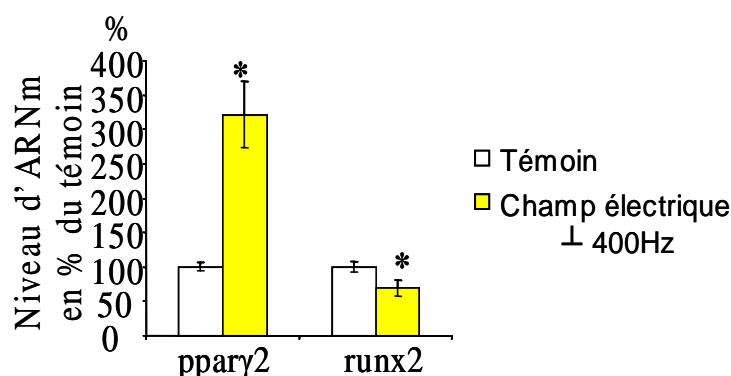


Figure 56 : Expression génique des marqueurs de différenciation PPAR γ 2 et Runx2 normalisée par l'expression du gène de ménage, la cyclophiline. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm écart type. n = 6; Témoin vs champ électrique $p < 0,05$.

Par PCR quantitative en temps réel, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de PPAR γ 2, facteur de transcription spécifique de la lignée adipocytaire, et une

diminution de celle de Runx2, facteur transcriptionnel majeur dans la régulation de l'ostéoblastogénèse [Figure 56](#).

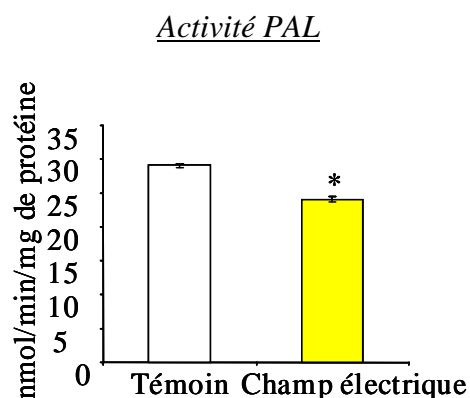


Figure 57: Activité PAL mesurée sur lysats cellulaires des C3H10T1/2. Résultats exprimés en nmol/min/mg de protéine à 5 jours, en moyenne \pm erreur type. n = 4; Témoin vs champ électrique p<0,05.

L'activité de la PAL est inhibée par les 5 épisodes de champ électrique [Figure 57](#).

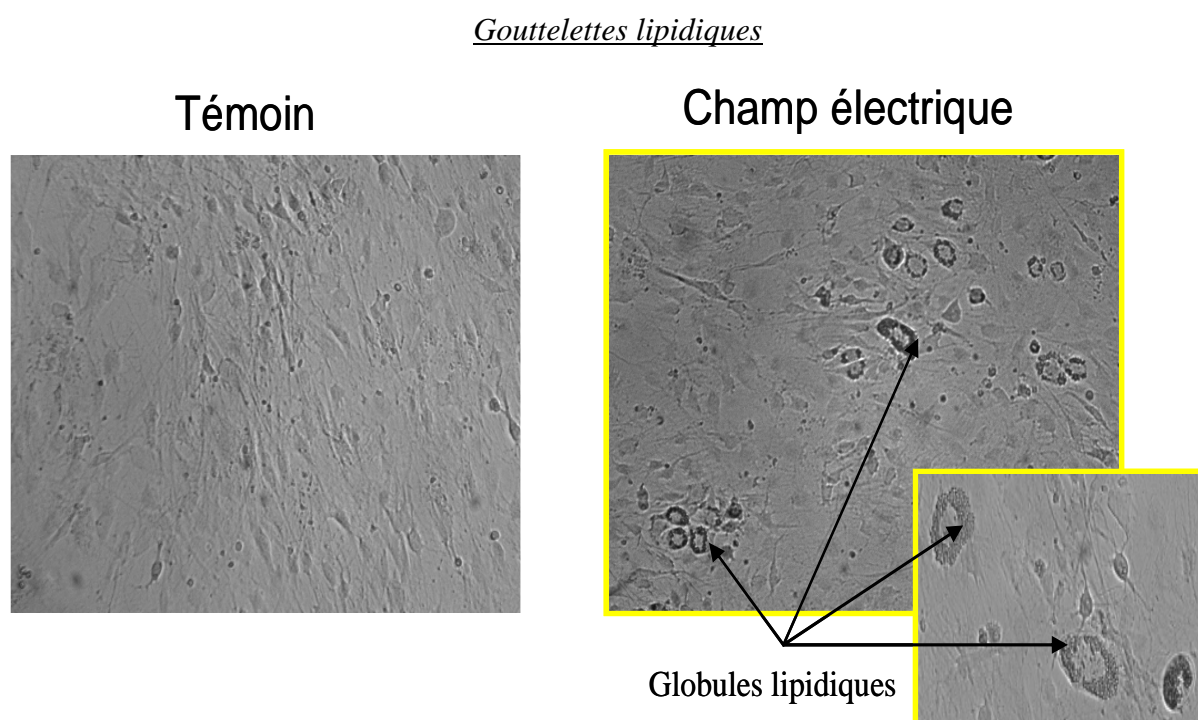


Figure 58 : Photographies au contraste de phase (X100) des cultures C3H10T1/2 Témoin ou sous champ électrique \perp 400hz pendant 5 jours

On observe une accumulation de gouttelettes lipidiques visible au microscope en contraste de phase dans les cellules soumises au champ électrique [Figure 58](#).

Les résultats obtenus au niveau de l'expression génique des marqueurs de différenciation sont

confirmés par les marqueurs protéiques de différenciation. L'expression de $PPAR\gamma_2$ est triplée dans les cellules soumises au champ électrique et les globules lipidiques sont plus nombreux, ces résultats indiquent donc une augmentation de l'adipogénèse. Cette induction de l'adipogénèse est contre-balancée par une diminution de l'ostéoblastogénèse puisque l'expression de Runx2 et l'activité de la PAL sont réduites.

En résumé, le champ électrique perpendiculaire influence l'engagement vers un lignage des cellules stromales pluripotentes (C3H10T1/2). En revanche, appliqué seul, il n'affecte pas l'expression et la production du VEGF des cellules déjà engagées dans la voie ostéoblastique (MC3T3-E1 et ostéoblastes primaires).

V.2.3. Réponses cellulaires à la double stimulation (champ électrique et stimulation mécanique BAHF)

Les réponses cellulaires à la double stimulation ont été étudiées sur les MC3T3-E1 et sur les cellules primaires humaines. Nous obtenons les mêmes résultats pour les deux lignées. Nous présenterons en détail les résultats obtenus sur les cellules primaires car ils sont plus complets au niveau de l'expression génique (étude des isoformes et cinétique d'expression).

➤La prolifération

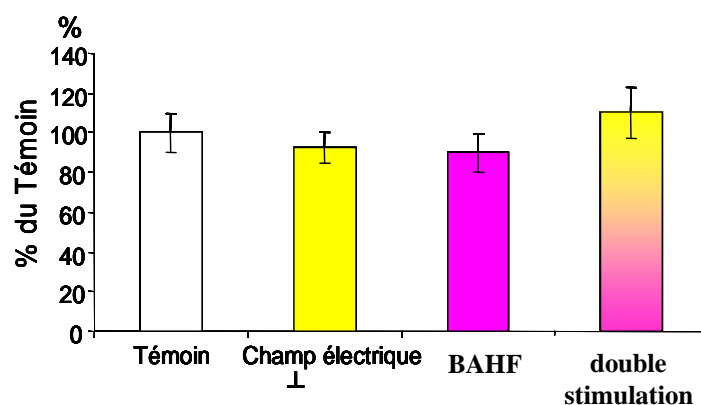


Figure 59 : Prolifération des cellules primaires humaines. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs Témoin à 3 jours, en moyenne \pm écart type. $n = 4$; $p < 0,05$.

La prolifération des ostéoblastes primaires n'est pas affectée par les stimulations séparées ni par la double stimulation. Ce résultat est confirmé sur les MC3T3-E1 [Figure 59](#).

➤Le VEGF

Expression génique du VEGF

Pour réaliser une cinétique de l'expression des isoformes du VEGF, les ARNm des ostéoblastes primaires ont été extraits 6h, 8h et 12h après le premier épisode de double stimulation : champ électrique (14h) et BAHF (20min).

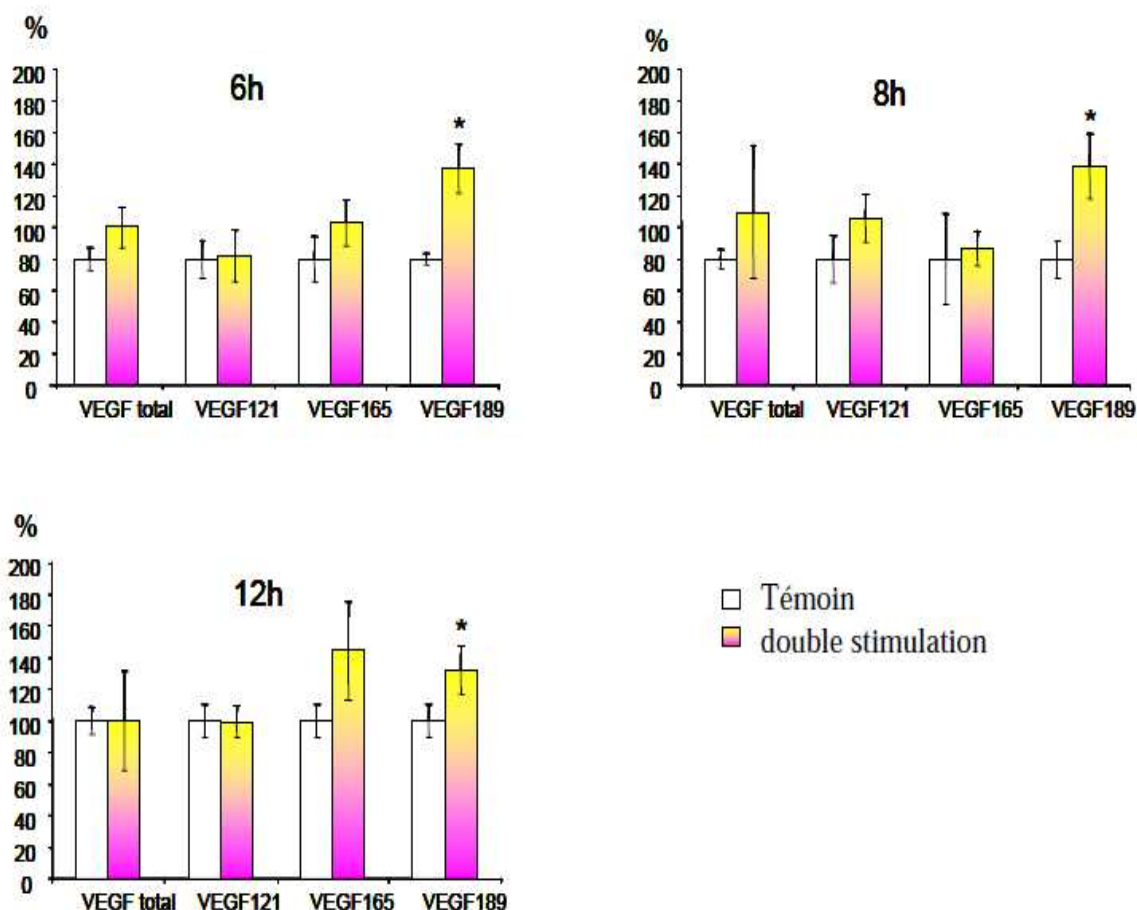


Figure 60 : Expression génique des isoformes du VEGF des ostéoblastes primaires normalisée par l'expression du gène de ménage, cyclophiline. Résultats exprimés en pourcentage des valeurs témoins, en moyenne \pm écart type. n = 4; Témoin vs double stimulation p<0,05.

L'isoforme 189, forme matricielle du VEGF, est augmentée par la double stimulation pour les 3 temps étudiés, son pic d'expression se situant entre 6 et 8h [Figure 60](#).

Pour les MC3T3-E1, nous n'avons pas pu analyser chacune des isoformes car elles n'étaient pas exprimées en quantité suffisante pour réaliser des PCR avec une efficacité correcte.

Le dosage protéique du VEGF

Les protéines ont été extraites 24h après le 3^{ème} épisode de stimulation mixte.

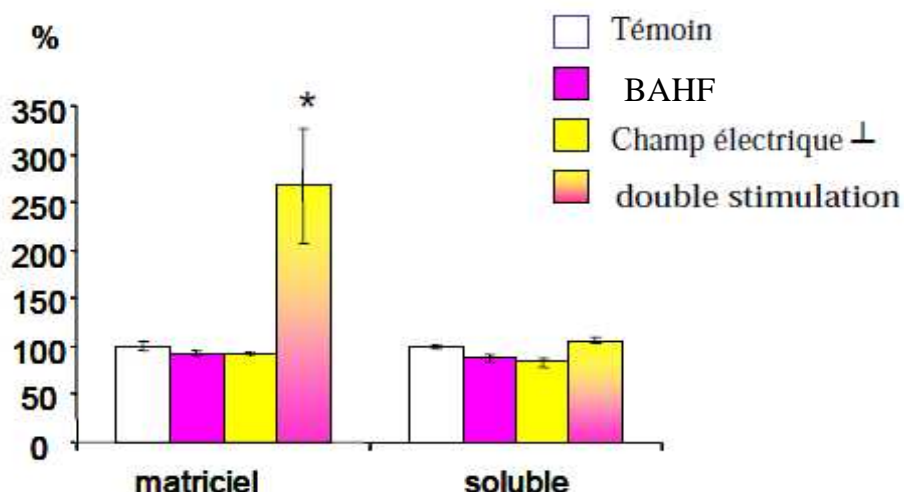


Figure 61 : Taux protéique de VEGFA des ostéoblastes primaires mesuré sur lysats cellulaires (VEGF matriciel) ou milieu de culture (VEGF soluble). Résultats exprimés en pourcentage des valeurs Témoin à 3 jours, en moyenne \pm erreur type. n = 8; Témoin vs double stimulation $p < 0,05$.

La combinaison des stimulations électriques et mécaniques sur les cultures primaires augmente la production du VEGF matriciel. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de l'expression génique de l'isoforme 189. Lorsque les stimulations sont appliquées séparément, il n'y a pas d'effet sur la production du VEGF [Figure 61](#).

Le dosage du VEGF protéique sur les MC3T3-E1 apporte les mêmes résultats avec cependant une augmentation du VEGF matriciel moins marquée : +50% pour les MC3T3-E1 contre +170% pour les ostéoblastes primaires.

➤Expression des facteurs impliqués dans l'angiogénèse

Les résultats sur la cinétique d'expression du VEGF montrent que son pic d'expression est situé vers 8h, c'est donc à ce temps là que nous avons choisi d'extraire les ARNm des cellules primaires pour effectuer les analyses par microarray.

Synthèse des résultats

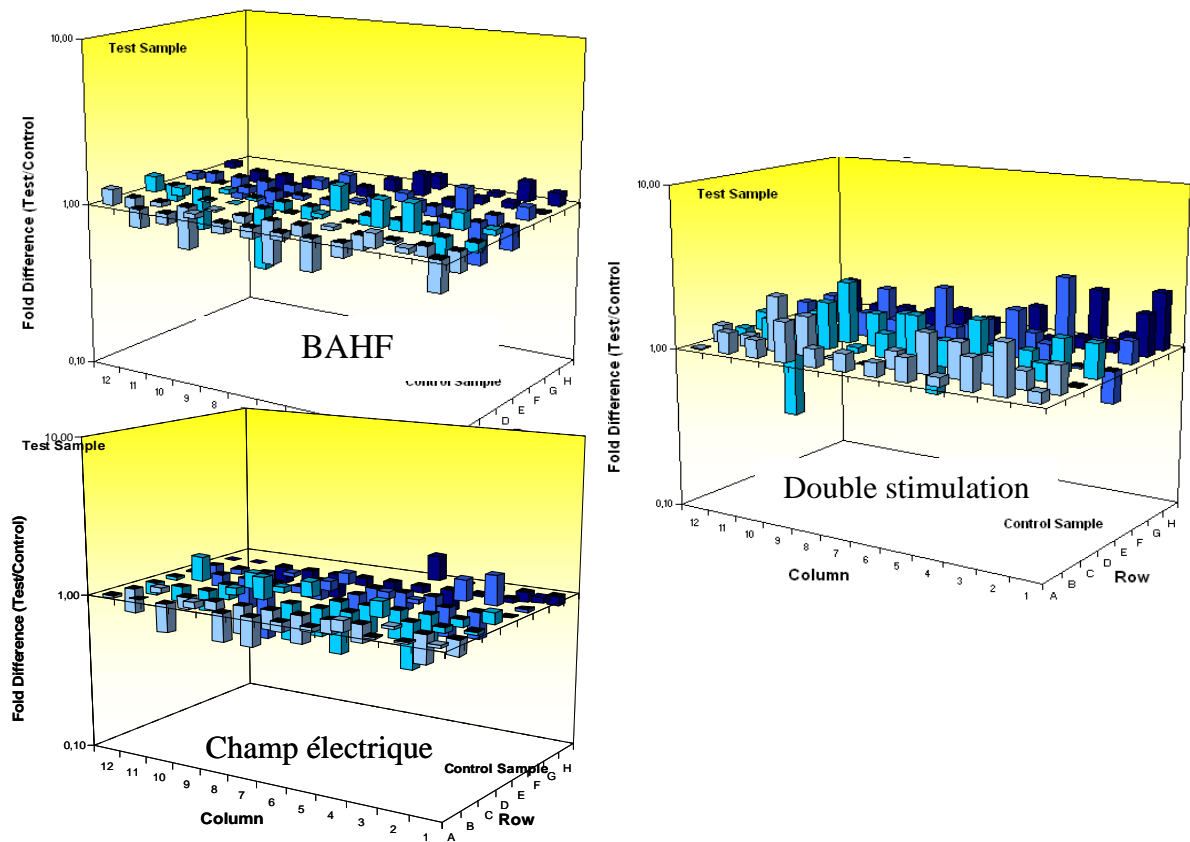


Figure 62: Expression génique des facteurs impliqués dans l'angiogénèse après 1 épisode de stimulation (BAHF, champ électrique[⊥] ou double stimulation) sur les ostéoblastes primaires. Valeurs exprimées par rapport aux témoins en moyenne n=2

En analysant ces résultats dans leur globalité, il apparaît clairement que les BAHF et le champ électrique appliqués séparément n'ont que très peu d'effet sur l'expression génique des facteurs impliqués dans l'angiogénèse. En revanche, la double stimulation induit l'augmentation de nombreux facteurs [Figure 62](#). Bien que les augmentations restent modérées, ce résultat vient confirmer notre hypothèse selon laquelle il est possible de potentialiser une stimulation mécanique par un champ électrique. Le nombre d'échantillons étant égal à 2, nous n'avons pas fait de statistique, cependant nos résultats peuvent être considérés comme de bons indicateurs car la technique du microarray est très reproductible : d'un échantillon à l'autre les valeurs trouvées diffèrent très peu (+/-10%).

Nous avons sélectionné les facteurs potentiellement intéressants pour l'ingénierie tissulaire et dont l'expression n'était pas ou peu affectée par les stimulations séparées mais dont l'expression était augmentée en présence de la double stimulation [Figure 63](#).

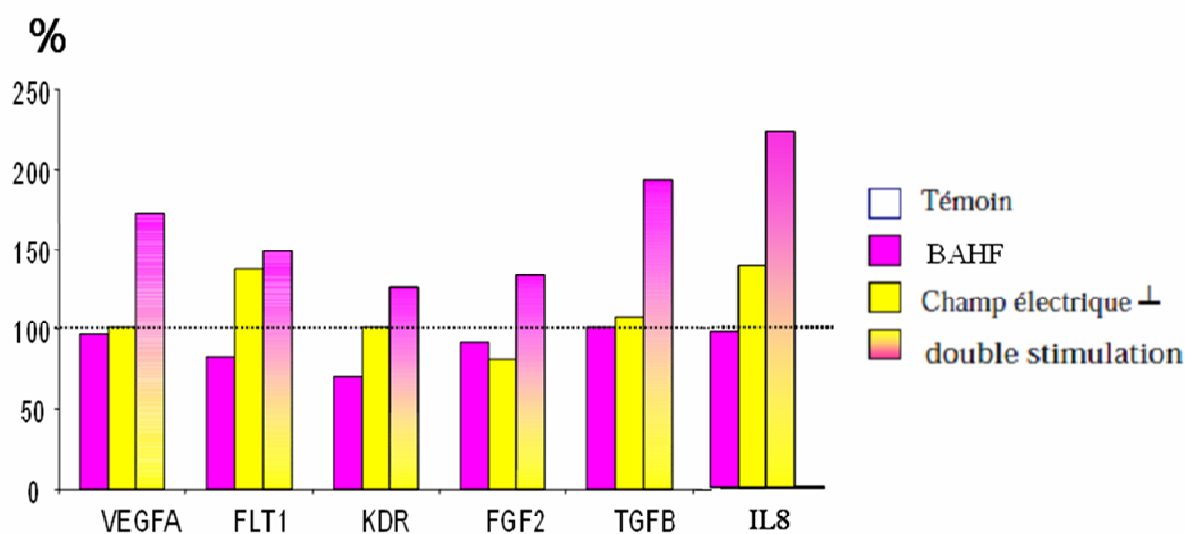


Figure 63 : Expression génique de facteurs impliqués dans l'angiogénèse après 1 épisode de stimulation (BAHF, champ électrique ou double stimulation) sur les ostéoblastes primaires. Valeurs exprimées par rapport aux témoins en moyenne n=2

Les BAHF ou le champ électrique n'affectent pas l'ARNm du VEGFA lorsqu'ils sont appliqués séparément, en revanche, lorsqu'ils sont appliqués en combinaison, l'expression génique du VEGFA augmente de 70%. Le microarray apporte donc la confirmation de l'augmentation de ce facteur angiogénique dès 1 épisode de double stimulation.

Les expressions géniques des récepteurs au VEGF, FLT1 et KDR, auraient tendance à diminuer sous l'effet des BAHF alors qu'elles ne le sont pas sous champ électrique. La combinaison des deux types de stimulations conservent le niveau d'expression obtenu avec le champ électrique seul (ou l'augmente légèrement).

L'expression du FGF2 est stable après l'application des stimulations de manière individuelle et elle aurait tendance à augmenter après la double stimulation (+34%). Le TGFβ1 se comporte de la même manière mais avec une augmentation plus prononcée après la double stimulation (90%). L'IL8 n'est pas affectée par les BAHF mais est légèrement augmentée par le champ électrique (+40%) et est multipliée par 2,2 par la stimulation mixte.

DISCUSSION GENERALE

► Les contraintes mécaniques BAHF

Dans la première partie de ce travail (**article 1**), nous avons étudié les réponses des ostéoblastes à des contraintes mécaniques complexes basées sur des signaux BAHF appliquées à un modèle de culture 3D. Nous montrons qu'une stimulation mécanique simple (sinusoïde de 3Hz, 1000 $\mu\epsilon$) peut être potentialisée par des signaux basse amplitude (<200 $\mu\epsilon$) mais seulement lorsque ces derniers sont appliqués à une fréquence appropriée. Nous avons ainsi défini un régime combiné (3Hz+25Hz) capable d'augmenter à la fois la production matricielle et le VEGF. Ce régime mécanique complexe se révèle ainsi plus efficace qu'un régime mécanique simple pour améliorer l'activité ostéoblastique.

Alors que la contrainte mécanique statique ne semble pas influencer l'adaptation tissulaire, un régime mécanique dynamique (périodique) est requis (Lanyon and Rubin 1984). Ce régime entraîne des modifications de l'environnement mécanique cellulaire, la cellule adaptant sa réponse en fonction des changements perçus dans le cadre d'interactions cellules/cellules, cellules/matrice. Parmi les paramètres (Torcasio, van Lenthe et al. 2008) pouvant intervenir dans la perception du signal, la fréquence du signal mécanique a été décrite comme un facteur important dans la réponse cellulaire, du fait que la fréquence du signal régule le nombre d'événements mécaniques (Faure, Linossier et al. 2008). L'amplitude du signal a également une importance sur la réponse cellulaire (Zhu, Zhang et al. 2009). Des études relativement récentes mettent cependant en évidence que c'est le régime mécanique lui-même, dans toutes ces composantes définies par la forme du signal, l'amplitude, la fréquence, qui influence les activités cellulaires et l'adaptation tissulaire. Par exemple, une stimulation mécanique entraîne une réponse tissulaire plus importante à basse amplitude et haute fréquence qu'à basse fréquence et haute amplitude (Qin, Rubin et al. 1998). Selon la théorie du mecanostat de Frost le tissu osseux ne serait pas sensible aux amplitudes de contraintes mécaniques inférieures à 200 $\mu\epsilon$, cependant cette théorie ne se base que sur l'amplitude des stimulations et ne tient pas compte de leur fréquence [Figure 16](#) (Basso and Heersche 2002). Etant donné que des signaux de faible amplitude modulent la réponse cellulaire et tissulaire s'ils sont appliqués à une fréquence adéquate, la théorie du mecanostat de Frost doit être modulée. L'adaptation cellulaire et tissulaire à la contrainte mécanique n'est pas proportionnelle à l'intensité du signal, elle est donc non-linéaire. La contrainte mécanique agit sur les cellules et

le tissu par d'autres phénomènes qu'une déformation directe du substrat et/ou de la surface cellulaire.

Nous pouvons proposer une explication à la sensibilité des ostéoblastes aux BAHF. A partir de nos résultats et d'autres études récentes, il se dégage une hypothèse qui pourrait expliquer l'action d'un faible stimulus mécanique sur les cellules osseuses. Elle se base sur une notion, sinon nouvelle, du moins peu étudiée dans le contexte de la mécanique osseuse : le signal basal est amplifié par le bruit de fond, engendrant un signal secondaire capable de stimuler la cellule. Cette théorie fait appel à une théorie connue sous le nom de résonance stochastique. La résonance stochastique est un effet non linéaire qui consiste en la possibilité d'améliorer la transmission d'un signal utile, au moyen d'une augmentation du bruit de fond dans le système. Cette théorie (Tanaka, Li et al. 2003) implique l'existence et l'importance de signaux mécaniques BAHF, associés au signal proprement dit. Cette théorie ne remet pas en cause l'importance d'un signal mécanique défini, cependant elle suggère que les vibrations aléatoires (bruit) potentialisent la réponse à un signal mécanique. Dans l'étude de Tanaka la forme du signal vibratoire évolue constamment de manière aléatoire. Nous avons voulu aller plus loin en isolant des fréquences et ainsi déterminer quelles sont les fréquences capables de potentialiser la réponse des ostéoblastes. Ainsi, dans notre étude le signal de faible amplitude type « vibration » possède une fréquence clairement définie. Nous montrons que la valeur de cette fréquence joue un rôle primordial dans la réponse cellulaire : Celle - ci n'est pas potentialisée par des fréquences de 50 et 100 Hz mais elle l'est pour une fréquence de 25Hz. Du point de vue physiologique, nous notons que cette fréquence de 25Hz correspond à la fréquence la plus représentée au cours de la marche dans la gamme supérieure à 10Hz. Ceci est illustré par la décomposition fréquentielle du signal de la marche après filtrage des basses fréquences (<10Hz) où l'on voit une prédominance des fréquences comprises entre 20 et 30Hz (Figure 64A thèse de David V. 2006). A l'inverse, après filtrage des hautes fréquences, on note, hormis le pic majoritaire à 1Hz, un autre pic à 3Hz (Figure 64B thèse de David V. 2006). Les deux fréquences, 3Hz et 25Hz, qui constituent le signal complexe défini dans cette étude correspondent à des fréquences majoritaires dans le signal de la marche.

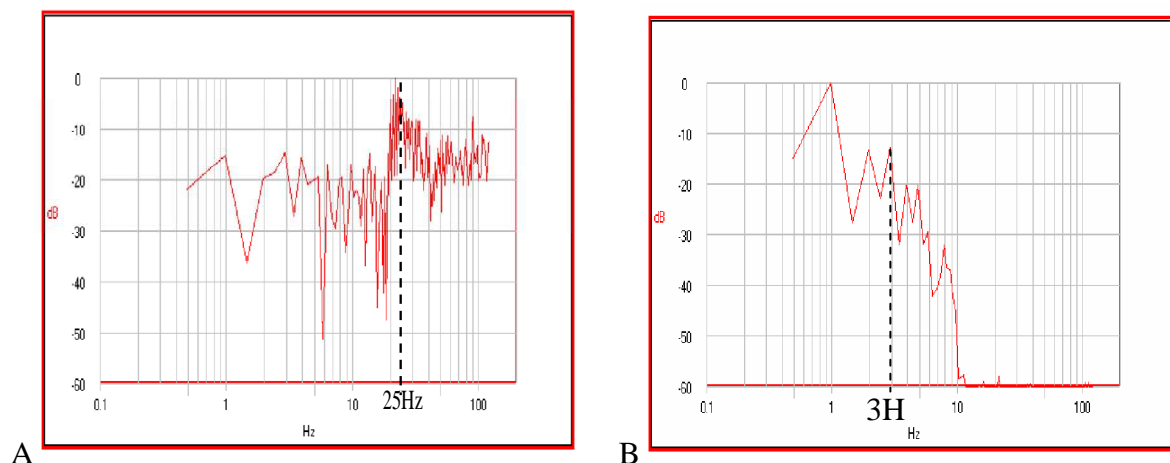


Figure 64 : Spectre fréquentiel de la marche, après filtrage des composantes fréquentielles (A) inférieures à 10 Hz et (B) au delà de 10 Hz. (Thèse David V. 2006)

Les résultats présentés dans le **deuxième article** démontrent que les ostéoblastes répondent à un signal mécanique de très BAHF sans que ce dernier soit porté par un signal basal. La théorie de la « résonance stochastique » n'explique donc pas toutes les réponses cellulaires aux BAHF, la réponse ostéoblastique pourrait être expliquée par un autre type de résonance : « la résonance harmonique ». En effet, l'existence d'harmoniques peut expliquer la réponse d'un système à des signaux mécaniques faibles. Le signal mécanique engendre des harmoniques (composantes hautes-fréquences) au niveau du substrat et de la surface cellulaire. Un corps est dit en vibration lorsqu'il est animé d'un mouvement oscillatoire autour d'une position d'équilibre ou de référence. Le profil, ou la forme, du signal mécanique périodique (cyclique, dynamique) est la résultante d'une superposition d'une fondamentale et de vibrations pures harmoniques. Une théorie serait que les vibrations cellulaires induites par un signal mécanique entraînent une résonance harmonique directe du cytosquelette. Les ondulations des filaments d'actine observées sous les BAHF pourraient être expliquées par cette théorie. Ce phénomène peut initier la réponse à un signal mécanique de faible intensité, pourvu que ce signal puisse entraîner directement ou indirectement la résonance du cytosquelette. En effet, la structure des cellules dépend des différents éléments du cytosquelette (microfilaments, microtubules...) mais aussi des forces extérieures qui s'exercent sur la cellule. Les réseaux du cytosquelette pourraient fonctionner comme des oscillateurs harmoniques couplés, étant capables de vibrer à l'unisson avec des fréquences caractéristiques. Ainsi, grâce au phénomène

de résonance le cytosquelette serait un intermédiaire permettant d'amplifier des signaux extrêmement faibles.

Les deux théories que l'on vient de développer, « résonance stochastique » évoquée dans l'article 1 et « résonance harmonique » suggérée par les résultats de l'article 2, peuvent co-exister si l'on assume l'existence d'un environnement vibratoire basal important que les cellules osseuses puissent détecter. En effet, à l'état basal, le fonctionnement cellulaire est assuré dans un environnement vibratoire défini par les signaux que les cellules et les tissus s'échangent en continu. Les cellules possèdent leurs propres rythmes oscillatoires tels que les vagues calciques qui régulent de nombreuses voies de signalisation intracellulaire (Kim, Seong et al. 2009). Un signal extérieur au système considéré, même minime en amplitude, peut entraîner une perte de cohérence de ces phénomènes de résonance. Les cellules détectent les BAHF en tant que perturbation de cette résonance et répondent en conséquence. Les différentes fréquences vibratoires pourraient être retranscrites sous forme de différents niveaux énergétiques, que la cellule est plus ou moins capable d'amplifier. Les contraintes de très faibles amplitudes seraient plutôt atténuées aux basses fréquences (1Hz) et amplifiées à hautes fréquences (20Hz) (Han, Cowin et al. 2004). L'hypothèse la plus probable est que le mécanisme d'excitation entraîne une amplification du signal par l'interaction matrice/cytosquelette.

➤ Les effets des signaux BAHF sur la matrice extracellulaire.

L'intégration d'un biomatériau au sein du tissu osseux dépend fortement des interactions présentes à l'interface os-biomatériau et des facteurs angiogéniques qui assurent la vascularisation de l'implant. La MEC servant d'interface doit notamment contribuer au recrutement des cellules hôtes et son ostéoinductivité est essentielle pour permettre l'orientation des CSMs vers le lignage ostéoblastique. Dans le modèle d'étude 3D (**article 1**) nous montrons qu'une combinaison spécifique de régimes mécaniques est capable d'augmenter à la fois les protéines matricielles (collagène et fibronectine) et le VEGF matriciel. Un domaine de liaison à la fibronectine a été identifié sur le VEGF (Wijelath, Murray et al. 2002). La quantité mais aussi l'organisation du réseau de fibronectine pourrait donc être déterminants pour améliorer le potentiel angiogénique ou même ostéogénique de la MEC. Que se soit dans le travail présenté dans l'article 1 ou 2 nous observons des modifications du réseau de fibronectine, un épaississement des fibres (**article 1**) ou une « alvéolisation » plus importante (**article 2**) sous contrainte mécanique. Nous montrons également dans l'article 2 que les très

BAHF augmentent les protéines majeures de la MEC, la fibronectine, le collagène de type I et l'ostéopontine. La géométrie de ce système 2D étant compatible avec une décellularisation, il nous a été possible d'évaluer les propriétés fonctionnelles de cette matrice grâce à un modèle de cellules non différenciées. La matrice déposée par des ostéoblastes stimulés améliore l'attachement initial des CSMs (C3H10T1/2) et favorise l'engagement vers la voie de différenciation ostéoblastique. De ce fait la MEC synthétisée sous BAHF combine de nombreux avantages puisqu'elle contient des composants et une topographie qui la rend pro-adhésive et pro-ostéogénique pour les CSMs, deux paramètres essentiels pour assurer une bonne ostéointégration.

La matrice déposée par les ostéoblastes stimulés à très faible amplitude exerce une action inhibitrice sur l'expression de PPAR γ , et plus précisément l'isoforme γ_2 , décrite comme un des facteurs clé de la différenciation adipocytaire. A l'inverse, les expressions des marqueurs de la différenciation ostéoblastique tels que le collagène de type I, la fibronectine et la PAL sont augmentées dans ces conditions. Ainsi, l'étude de l'expression génique et protéique de différents marqueurs de ces deux voies de différenciation laissent suggérer que l'ostéoblastogénèse induite par la nouvelle matrice a lieu aux dépens de l'adipogénèse.

D'autre part, Runx2 est connu pour exercer un contrôle sur les étapes précoces et tardives de la différenciation ostéoblastique (Franceschi, Xiao et al. 2003). Il a déjà été montré que la réponse cellulaire aux signaux de la matrice était en partie régulée par Runx2 (Prince, Banerjee et al. 2001). La régulation de Runx2 au cours de la différenciation ostéoblastique a beaucoup été discutée, les premières études ayant conduit leurs auteurs à affirmer que le rôle de Runx2 dans l'ostéoblastogénèse était uniquement contrôlé au niveau post traductionnel (Xiao, Cui et al. 1997; Xiao, Jiang et al. 2000). Cependant les rapports sont contradictoires au sujet du rôle potentiel de Runx2 dans la différenciation des cellules stromales humaines. En effet certaines études montrent l'implication de Runx2 dans l'ostéoblastogénèse soit par une augmentation linéaire de son expression au niveau protéique et ARNm (Prince, Banerjee et al. 2001) soit transitoire (Gori, Thomas et al. 1999), soit encore comme étant régulé au niveau traductionnel (Sudhakar, Li et al. 2001). Il en ressort que le contrôle de l'ostéoblastogénèse par Runx2 peut être multiple se situant au niveau transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel (par régulation de son activité soit par phosphorylation soit par interactions avec d'autres protéines). Ainsi, ces diverses régulations pourraient expliquer le fait que l'expression de Runx2 ne soit pas augmentée lorsque nous ensemençons les CSM sur une matrice synthétisée sous BAHF par rapport à la matrice contrôle mais qu'elle l'est lorsqu'on compare le plastique

et les matrices. On peut penser que les mécanismes de régulation sont différents pour ces deux situations.

➤Le champ électrique perpendiculaire

Nous avons montré que champ électrique perpendiculaire influence l'engagement vers un lignage des CSMs (C3H10T1/2). Au cours du développement, les cellules embryonnaires sont en partie contrôlées par des champs électriques endogènes (McCaig, Rajnicek et al. 2005). Si l'environnement électrique normal d'un embryon est perturbé par un champ électrique exogène, on observe des malformations au cours du développement embryonnaire de l'amphibien (position du blastopore, formation du tube neural...) (Metcalf and Borgens, 1994). Le rôle primordial des champs électriques endogènes sur les cellules embryonnaires pourrait expliquer le fait que, dans notre étude, les cellules non différenciées semblent plus sensibles à cette stimulation. Des champs électriques endogènes ont également été mesurés au niveau des sites de lésion de certains tissus, les plus étudiés étant l'épithélium de la peau et la cornée. Pour le tissu osseux, des données déjà anciennes (Friedenberg and Smith 1969), (Chakkalakal and Johnson 1981) montrent que le voltage est plus élevé au site de la fracture, la zone de lésion devenant entièrement chargée négativement. Les CSMs présentes dans le périoste (capacité de différenciation en ostéoblastes et chondrocytes) doivent être recrutées et se différencier pour assurer la réparation fracturaire (Bielby, Jones et al. 2007) ; le champ électrique relevé au niveau du site de lésion pourrait agir à ce niveau. D'autre part, une étude récente *in vitro* (Sundelacruz, Levin et al. 2008) a analysé les variations du potentiel de membrane des CSMs lors de leur différenciation. Les cellules différenciées en ostéoblastes ou adipocytes sont caractérisées par une hyperpolarisation par rapport aux cellules indifférenciées. Après 4 semaines en milieu différenciant, le potentiel de membrane des CSMs passe de -34mV à -93mV en milieu ostéogénique et de -47mV à -120mV en milieu adipocytaire. De plus, la dépolarisation de la membrane des CSMs empêche leur différenciation vers l'une ou l'autre voie. Dans notre étude, le champ électrique pourrait avoir modifié le potentiel de membrane des CSMs conduisant à une hyperpolarisation qui aurait agit sur la différenciation cellulaire. Cependant, d'une part, nous n'avons pas évalué la fraction de cellules non différenciées et d'autre part, cette hypothèse n'explique pas pourquoi la différenciation s'oriente plutôt vers la voie adipogénique. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer comment des variations dans le potentiel de membrane pouvaient se traduire en cascade de signalisation

(flux calciques, phosphatase voltage sensitive, PTEN (Phosphatase and TENsin homolog)...) (Levin 2007) et ainsi contrôler la différenciation des CSMs. Utiliser le champ électrique pour manipuler les CSMs pourrait se révéler être un outil utile en ingénierie tissulaire ; cependant il est indispensable de maîtriser ces effets. Il faudrait notamment mesurer les variations du potentiel de membrane engendrées par notre dispositif.

Dans notre étude, le champ électrique a été appliqué sur des cultures 2D pour lesquelles les modélisations sont assez complexes. Pour poursuivre ce travail avec une approche en ingénierie tissulaire, il serait intéressant de mener une étude utilisant des substrats 3D ne présentant pas de multiples interfaces et pour lesquels on pourrait modéliser le champ électrique appliqué. Nous pensons notamment aux gels de collagène. Des fibroblastes cultivés en gel de collagène (Sun, Titushkin et al. 2006) s'orientent perpendiculairement au champ électrique et réorganisent les fibres de collagène dans leur proche environnement. Le champ électrique est aujourd'hui la seule solution connue pour contrôler de l'orientation cellulaire dans des matériaux 3D ne présentant pas de topographie particulière. Il n'a pas encore été utilisé sur les substituts osseux, pourtant la maîtrise de l'orientation des ostéoblastes dans les biomatériaux pourrait contrôler la disposition des fibres de collagène et l'organisation de la matrice. Ainsi, le champ électrique peut être vu comme un acteur de l'organisation tissulaire souhaitée à l'intérieur du biomatériau.

Le champ électrique appliqué seul n'affecte pas l'expression et la production du VEGF des cellules déjà engagées dans la voie ostéoblastique (MC3T3-E1 et ostéoblastes primaires).

➤La double stimulation (champ électrique + BAHF)

Notre objectif étant d'améliorer à la fois la MEC et la production de facteurs pro-angiogéniques, nous avons associé les signaux très BAHF et le champ électrique. Un protocole développé sur les cultures ostéoblastiques primaires nous a permis de mettre en parallèle les 4 conditions (témoin, BAHF, champ électrique et stimulation mixte). Lorsque les stimulations sont appliquées séparément, la production du VEGF ou l'expression génique d'autres facteurs de croissance comme le TGF β 1 ou le FGF2 ne sont pas modifiées. Sur les cultures ostéoblastiques primaires, seule la stimulation mixte permet d'augmenter leur expression ou leur production pour le VEGF. Ces résultats ne semblent pas être « lignée dépendant » puisque l'augmentation du VEGF a été vérifiée pour une double stimulation sur les MC3T3-E1.

A ce stade, nous disposons de peu de données pour interpréter les réponses cellulaires à

la double stimulation. Pour avancer dans cette problématique, il faut s'intéresser aux voies de signalisation. Plusieurs hypothèses ont été envisagées. Le champ électrique serait capable de sensibiliser les ostéoblastes aux BAHF : par exemple, sous l'effet du champ électrique, certaines protéines soumises à des forces électrostatiques pourraient changer de conformation et permettre de déclencher de nouvelles voies de signalisation activées par la contrainte mécanique. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions inverser l'ordre des stimulations (les BAHF seraient appliquées avant le champ électrique) afin de voir si la réponse cellulaire est la même.

Les voies de signalisations activées par le champ électrique et celles activées par les BAHF ne sont pas connues. Cependant on pourrait penser que celles-ci agissent en synergie. L'addition de leurs effets permettrait d'atteindre un seuil qui serait alors en mesure de déclencher une réponse cellulaire. Ainsi, dans notre étude, les simples stimulations ne seraient pas assez efficaces pour déclencher la production de FGF2 et du TGF β 1 alors que celle-ci est augmentée par les doubles stimulations. Ces deux facteurs de croissance sont bien connus pour leurs effets sur le VEGF. Ces facteurs de croissance empruntent deux voies de signalisation indépendantes. La stimulation du VEGF par le TGF β 1 dans les ostéoblastes est régulée par les Rho-kinases et l'activation des SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) (Kuno, Takai et al. 2009). Le FGF2 régule de manière dose dépendante le VEGF en passant par une voie de signalisation différente : il augmente l'expression de plusieurs cytokines (IL-6, IL-8) impliquées dans l'expression du VEGF (Reher, Doan et al. 1999). Dans notre étude, les résultats semblent montrer que l'induction du VEGF passe au moins en partie par l'augmentation de l'IL8 dans le cas de la double stimulation (+125%).

La combinaison des très BAHF et du champ électrique a l'intérêt majeur de jouer à la fois sur la production de matrice et celle des facteurs de croissance, deux paramètres essentiels à l'ostéointégration d'un substitut osseux. Pour se rapprocher des propriétés des matériaux piezoélectriques, il faudrait coupler les deux stimulations en les appliquant de manière concomitante. Dans notre protocole actuel, les deux sollicitations ont des durées très différentes (14h pour le champ électrique et 20 minutes pour les BAHF). Nous avons pensé fractionner la séquence de 20 minutes en plusieurs épisodes de 2 minutes mais il s'avère que cette modalité de contrainte fractionnée a moins de conséquence sur les protéines matricielles (voir résultats complémentaire de l'article 2). Appliquer 14h de stimulation BAHF est envisageable à condition qu'une durée d'application aussi longue ne soit pas délétère pour les cellules. Un autre moyen de coupler ces stimulations serait de cultiver les ostéoblastes directement dans des matériaux piezoélectriques biocompatibles. Cependant, à l'heure actuelle,

ce type de biomatériau n'est pas disponible sur le marché. Le polyvinylidène fluorure (PVDF) serait un matériau piézoélectrique intéressant car il possède une bonne biocompatibilité, mais on ne le trouve que sous forme de membrane 2D ou de monofilament pour les sutures (Laroche, Marois et al. 1995; Bouaziz, Richert et al. 1997). Une équipe (Itoh, Nakamura et al. 2006), (Wang, Itoh et al. 2009) travaille actuellement avec des HAP poreux polarisés électriquement en surface. Trois semaines après l'implantation, la croissance osseuse est augmentée dans les céramiques polarisées par rapport aux implants non chargés. Dans leurs conditions, les surfaces chargées négativement ou positivement stimulent l'activité ostéoblastique alors que les surfaces positives inhibent les activités ostéoclastiques (Itoh, Nakamura et al. 2006). Une porosité plus importante (75% versus 50%) de la céramique implantée influe sur la répartition des charges électriques à la surface des pores et augmente les activités ostéogéniques. Cependant, le mécanisme par lequel la polarisation augmente la formation osseuse au cœur du matériau n'est pas expliqué; il est probable que le champ électrique interne résiduel (induit par la polarisation) affecte les activités cellulaires. Récemment des matériaux composites d'hydroxyapatite et de titanate de barium ont été développés (Rodriguez-Ruiz and Suaste-Gomez 2007; Baxter, Turner et al. 2009). L'étude n'en n'est qu'aux tests de biocompatibilité. L'attachement, la prolifération, la morphologie et l'activité métabolique des ostéoblastes sur ce matériau contenant des éléments piézoélectriques sont comparables à ce qui est observé sur les céramiques d'hydroxyapatite commercialisées. Cette biocompatibilité doit cependant être confirmée sur un plus long terme. D'autre part, il serait intéressant de contraindre mécaniquement ce type de matériau piézoélectrique pour engendrer des modifications de charges et créer un champ électrique. Les cellules seraient alors soumises simultanément aux deux types de stimulations physiques ce qui, d'après nos résultats, pourraient améliorer l'ostéogénèse.

CONCLUSION GENERALE

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré qu'un signal complexe ayant deux composantes fréquentielles appliqué à des céramiques macroporeuses cellularisées était le plus favorable pour la production de matrice et la synthèse du VEGF matriciel. Nous disposons donc d'un modèle d'étude 3D à la fois intéressant dans des perspectives d'implantation et pour des recherches plus fondamentales.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux réponses cellulaires typiquement produites par les matériaux piézoélectriques : des signaux mécaniques très BAHF et des champs électriques. Les signaux très BAHF améliorent la synthèse de la MEC mais seule la combinaison de ces deux types de stimulation physique a permis d'augmenter les facteurs impliqués dans l'angiogénèse (VEGF, TGF β 1, FGF2...). Ces résultats préliminaires sont autant d'encouragements pour le développement de biomatériaux ayant des propriétés piézoélectriques ou incluant des éléments piézoélectriques qui favoriseraient la croissance osseuse par stimulation mécanique ou/et électrique.

Globalement, ces résultats montrent que des contraintes mécaniques de BAHF engendrent des réponses ostéoblastiques qui peuvent être amplifiées ou enrichies par la combinaison avec une autre stimulation physique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaron, R. K., D. M. Ciombor, et al. (2006). "Clinical biophysics: the promotion of skeletal repair by physical forces." *Ann N Y Acad Sci* **1068**: 513-31.
- Abdennagy, B., M. Hott, et al. (1992). "Effects of platelet-derived growth factor on human and mouse osteoblastic cells isolated from the trabecular bone surface." *Cell Biol Int Rep* **16**(3): 235-47.
- Abeed, R. I., M. Naseer, et al. (1998). "Capacitively coupled electrical stimulation treatment: results from patients with failed long bone fracture unions." *J Orthop Trauma* **12**(7): 510-3.
- Adachi, T., Y. Osako, et al. (2006). "Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration." *Biomaterials* **27**(21): 3964-72.
- Adachi, T., K. Sato, et al. (2003). "Directional dependence of osteoblastic calcium response to mechanical stimuli." *Biomech Model Mechanobiol* **2**(2): 73-82.
- Ahn, A. C. and A. J. Grodzinsky (2009). "Relevance of collagen piezoelectricity to "Wolff's Law": A critical review." *Med Eng Phys*.
- Akai, M., Y. Shirasaki, et al. (1997). "Electrical stimulation on joint contracture: an experiment in rat model with direct current." *Arch Phys Med Rehabil* **78**(4): 405-9.
- Alexa, O. (1996). "[Electrically induced osteogenesis. II. Experimental studies]." *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* **100**(1-2): 62-5.
- Amoroso, A., F. Del Porto, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor: a key mediator of neoangiogenesis. A review." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **1**(1-3): 17-25.
- Antonsson, E. K. and R. W. Mann (1985). "The frequency content of gait." *J Biomech* **18**(1): 39-47.
- Arsenault, M. E., H. Zhao, et al. (2007). "Confinement and manipulation of actin filaments by electric fields." *Biophys J* **93**(8): L42-4.
- Aubin, J. E., F. Liu, et al. (1995). "Osteoblast and chondroblast differentiation." *Bone* **17**(2 Suppl): 77S-83S.
- Bacabac, R. G., T. H. Smit, et al. (2004). "Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent." *Biochem Biophys Res Commun* **315**(4): 823-9.
- Bacabac, R. G., T. H. Smit, et al. (2006). "Bone cell responses to high-frequency vibration stress: does the nucleus oscillate within the cytoplasm?" *Faseb J* **20**(7): 858-64.
- Baiotto, S., B. Labat, et al. (2009). "Bone remodeling regulation under unloading conditions: numerical investigations." *Comput Biol Med* **39**(1): 46-52.
- Baker, J., J. P. Liu, et al. (1993). "Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth." *Cell* **75**(1): 73-82.
- Baneyx, G., L. Baugh, et al. (2002). "Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8): 5139-43.
- Bassett, C. A. and R. O. Becker (1962). "Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress." *Science* **137**: 1063-4.
- Bassett, C. A., R. J. Pawluk, et al. (1964). "Effects Of Electric Currents On Bone In Vivo." *Nature* **204**: 652-4.
- Basso, N. and J. N. Heersche (2002). "Characteristics of in vitro osteoblastic cell loading models." *Bone* **30**(2): 347-51.
- Baxter, F. R., I. G. Turner, et al. (2009). "An in vitro study of electrically active hydroxyapatite-barium titanate ceramics using Saos-2 cells." *J Mater Sci Mater Med* **20**(8): 1697-708.

- Bentmann, A., N. Kawelke, et al. (2009). "Circulating Fibronectin Affects Bone Matrix While Osteoblast Fibronectin Modulates Osteoblast Function." *J Bone Miner Res*. Volume 9999 Issue 999A, Pages 1 - 30
- Bhatt, K. A., E. I. Chang, et al. (2007). "Uniaxial mechanical strain: an in vitro correlate to distraction osteogenesis." *J Surg Res* **143**(2): 329-36.
- Bielby, R., E. Jones, et al. (2007). "The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone." *Injury* **38 Suppl 1**: S26-32.
- Binkley, N. C. and J. W. Suttie (1995). "Vitamin K nutrition and osteoporosis." *J Nutr* **125**(7): 1812-21.
- Bouaziz, A., A. Richert, et al. (1997). "Vascular endothelial cell responses to different electrically charged poly(vinylidene fluoride) supports under static and oscillating flow conditions." *Biomaterials* **18**(2): 107-12.
- Boutahar, N., A. Guignandon, et al. (2004). "Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation." *J Biol Chem* **279**(29): 30588-99.
- Brakebusch, C. and R. Fassler (2003). "The integrin-actin connection, an eternal love affair." *Embo J* **22**(10): 2324-33.
- Brighton, C. T., B. Strafford, et al. (1991). "The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone cells of rats to cyclic biaxial mechanical strain." *J Bone Joint Surg Am* **73**(3): 320-31.
- Brighton, T. C. (1981). "The Treatment of Non-Unions with Electricity." *J. Bone Jt. Surg.* **63A**:847-851.
- Brown, M. J. and L. M. Loew (1994). "Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent." *J Cell Biol* **127**(1): 117-28.
- Burger, E. H. and J. Klein-Nulen (1999). "Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro." *Adv Dent Res* **13**: 93-8.
- Canalis, E., T. McCarthy, et al. (1988). "Isolation of growth factors from adult bovine bone." *Calcif Tissue Int* **43**(6): 346-51.
- Carvalho, R. S., A. Bumann, et al. (2002). "Predominant integrin ligands expressed by osteoblasts show preferential regulation in response to both cell adhesion and mechanical perturbation." *J Cell Biochem* **84**(3): 497-508.
- Chakkalakal, D. A. and M. W. Johnson (1981). "Electrical properties of compact bone." *Clin Orthop Relat Res*(161): 133-45.
- Chen, D., M. Zhao, et al. (2004). "Bone morphogenetic proteins." *Growth Factors* **22**(4): 233-41.
- Cheng, M., G. Zaman, et al. (1999). "Mechanical strain stimulates ROS cell proliferation through IGF-II and estrogen through IGF-I." *J Bone Miner Res* **14**(10): 1742-50.
- Chevalier, J. (2009). "Les Biomatériaux. <http://spiral.univ-lyon1.fr/files_m/M7361/Files/477616_4852.pdf>."
- Chunqiu, Z., Z. Xizheng, et al. (2006). "Direct compression as an appropriately mechanical environment in bone tissue reconstruction in vitro." *Med Hypotheses* **67**(6): 1414-8.
- Ciombor, D. M. and R. K. Aaron (2005). "The role of electrical stimulation in bone repair." *Foot Ankle Clin* **10**(4): 579-93, vii.
- Cowin, S. C., L. Moss-Salentijn, et al. (1991). "Candidates for the mechanosensory system in bone." *J Biomech Eng* **113**(2): 191-7.
- Curtze, S., M. Dembo, et al. (2004). "Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells." *J Cell Sci* **117**(Pt 13): 2721-9.
- Dalby, M. J., N. Gadegaard, et al. (2007). "Nanotopographical control of human osteoprogenitor differentiation." *Curr Stem Cell Res Ther* **2**(2): 129-38.

- Datta, N., H. L. Holtorf, et al. (2005). "Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells." *Biomaterials* **26**(9): 971-7.
- Datta, N., Q. P. Pham, et al. (2006). "In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(8): 2488-93.
- David, V., A. Guignandon, et al. (2008). "Ex Vivo bone formation in bovine trabecular bone cultured in a dynamic 3D bioreactor is enhanced by compressive mechanical strain." *Tissue Eng Part A* **14**(1): 117-26.
- David, V., A. Martin, et al. (2007). "Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis." *Endocrinology* **148**(5): 2553-62.
- Deckers, M. M., M. Karperien, et al. (2000). "Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation." *Endocrinology* **141**(5): 1667-74.
- Demarteau, O., D. Wendt, et al. (2003). "Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **310**(2): 580-8.
- Di Palma, F., A. Chamson, et al. (2004). "Physiological strains remodel extracellular matrix and cell-cell adhesion in osteoblastic cells cultured on alumina-coated titanium alloy." *Biomaterials* **25**(13): 2565-75.
- Di Palma, F., M. Douet, et al. (2003). "Physiological strains induce differentiation in human osteoblasts cultured on orthopaedic biomaterial." *Biomaterials* **24**(18): 3139-51.
- Dodds, R. A., N. Ali, et al. (1993). "Early loading-related changes in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat fibulae in vivo." *J Bone Miner Res* **8**(3): 261-7.
- Ducy, P., C. Desbois, et al. (1996). "Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice." *Nature* **382**(6590): 448-52.
- Ducy, P. and G. Karsenty (1995). "Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene." *Mol Cell Biol* **15**(4): 1858-69.
- Dufour, C., X. Holy, et al. (2007). "Skeletal unloading induces osteoblast apoptosis and targets alpha5beta1-PI3K-Bcl-2 signaling in rat bone." *Exp Cell Res* **313**(2): 394-403.
- Dufour M, P. M., Viel E. (2007.). "Caractéristiques physiques des tissus vivants. Biomécanique fonctionnelle rappels anatomiques, stabilités, mobilités, contraintes membres, tête, tronc: Membres-Tête-Tronc." *Elsevier Masson*; p 57-8.
- Dumas, V., A. Perrier, et al. (2009). "The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression." *Biomaterials* **30**(19): 3279-88.
- El-Ghannam, A. (2005). "Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering." *Expert Rev Med Devices* **2**(1): 87-101.
- Endresen, L. P., K. Hall, et al. (2000). "A theory for the membrane potential of living cells." *Eur Biophys J* **29**(2): 90-103.
- Faure, C., M. T. Linossier, et al. (2008). "Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation." *Bone* **42**(6): 1092-101.
- Fear, E. C. and M. A. Stuchly (1998). "Modeling assemblies of biological cells exposed to electric fields." *IEEE Trans Biomed Eng* **45**(10): 1259-71.
- Fei, I. K. e. J. (2006). "Communication ASBMR: abstracts 1004 et 296."

- Fermor, B., R. Gundle, et al. (1998). "Primary human osteoblast proliferation and prostaglandin E2 release in response to mechanical strain in vitro." *Bone* **22**(6): 637-43.
- Ferrier, J., S. M. Ross, et al. (1986). "Osteoclasts and osteoblasts migrate in opposite directions in response to a constant electrical field." *J Cell Physiol* **129**(3): 283-8.
- Finkelstein, E., W. Chang, et al. (2004). "Roles of microtubules, cell polarity and adhesion in electric-field-mediated motility of 3T3 fibroblasts." *J Cell Sci* **117**(Pt 8): 1533-45.
- Fisher, L. W. and N. S. Fedarko (2003). "Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins." *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**: 33-40.
- Flexcell, I. (1997). "FX-2000 Upgrade Information Packet. Unpublished product information, Flexcell International Corporation."
- Fox, S. W., T. J. Chambers, et al. (1996). "Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation." *Am J Physiol* **270**(6 Pt 1): E955-60.
- Fox, S. W. and J. W. Chow (1998). "Nitric oxide synthase expression in bone cells." *Bone* **23**(1): 1-6.
- Franceschi, R. T. and G. Xiao (2003). "Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways." *J Cell Biochem* **88**(3): 446-54.
- Franceschi, R. T., G. Xiao, et al. (2003). "Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation." *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**: 109-16.
- Friedenberg, Z. B. and H. G. Smith (1969). "Electrical potentials in intact and fractured tibia." *Clin Orthop Relat Res* **63**: 222-5.
- Fritton, S. P., K. J. McLeod, et al. (2000). "Quantifying the strain history of bone: spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains." *J Biomech* **33**(3): 317-25.
- Fromigue, O., P. J. Marie, et al. (1997). "Differential effects of transforming growth factor beta2, dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D on human bone marrow stromal cells." *Cytokine* **9**(8): 613-23.
- Fromigue, O., P. J. Marie, et al. (1998). "Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation." *J Cell Biochem* **68**(4): 411-26.
- Frost, H. M. (1987). "Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal." *Anat Rec* **219**(1): 1-9.
- Fukada, E. Y. (1957). "On The Piezoelectric Effect of Bone." *Journal of the Physical Society of Japan*, vol. 12, no. 10, pp. 1158-1162.
- Gan, J. C. and P. A. Glazer (2006). "Electrical stimulation therapies for spinal fusions: current concepts." *Eur Spine J* **15**(9): 1301-11.
- Garnero, P. (2000). "Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk." *Osteoporos Int* **11 Suppl 6**: S55-65.
- Garnero, P., O. Borel, et al. (2006). "Extracellular post-translational modifications of collagen are major determinants of biomechanical properties of fetal bovine cortical bone." *Bone* **38**(3): 300-9.
- Gazzerro, E. and E. Canalis (2006). "Bone morphogenetic proteins and their antagonists." *Rev Endocr Metab Disord* **7**(1-2): 51-65.
- Geiger, B., A. Bershadsky, et al. (2001). "Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(11): 793-805.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." *Science* **285**(5430): 1028-32.
- Goldberg, H. A., K. J. Warner, et al. (2001). "Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite." *Connect Tissue Res* **42**(1): 25-37.

- Gross, D. and W. S. Williams (1982). "Streaming potential and the electromechanical response of physiologically-moist bone." *J Biomech* **15**(4): 277-95.
- Guignandon, A., O. Akhouayri, et al. (2003). "Focal contact clustering in osteoblastic cells under mechanical stresses: microgravity and cyclic deformation." *Cell Commun Adhes* **10**(2): 69-83.
- Hamed, A., P. Kim, et al. (2006). "Synthesis of nitric oxide in human osteoblasts in response to physiologic stimulation of electrotherapy." *Ann Biomed Eng* **34**(12): 1908-16.
- Han, Y., S. C. Cowin, et al. (2004). "Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16689-94.
- Harjanto, D. and M. H. Zaman "Matrix mechanics and receptor-ligand interactions in cell adhesion." *Org Biomol Chem* **8**(2): 299-304.
- Harmey, D., K. A. Johnson, et al. (2006). "Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in Akp2(-/-) mice." *J Bone Miner Res* **21**(9): 1377-86.
- Harris, N. L., K. R. Rattray, et al. (2000). "Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis." *Bone* **27**(6): 795-802.
- Hart, F. X. (2006). "Integrins may serve as mechanical transducers for low-frequency electric fields." *Bioelectromagnetics* **27**(6): 505-8.
- Hart, F. X. (2008). "The mechanical transduction of physiological strength electric fields." *Bioelectromagnetics* **29**(6): 447-55.
- Hart, F. X. (2009). "Cytoskeletal forces produced by extremely low-frequency electric fields acting on extracellular glycoproteins." *Bioelectromagnetics*.
- Hartig, M., U. Joos, et al. (2000). "Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro." *Eur Biophys J* **29**(7): 499-506.
- Helfrich, M. H., D. E. Evans, et al. (1997). "Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures." *J Bone Miner Res* **12**(7): 1108-15.
- Herring, G. M. (1968). "Studies on the protein-bound chondroitin sulphate of bovine cortical bone." *Biochem J* **107**(1): 41-9.
- Holy, C. E., M. S. Shoichet, et al. (2000). "Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period." *J Biomed Mater Res* **51**(3): 376-82.
- Holy, X. and E. Zerath (2000). "Bone mass increases in less than 4 wk of voluntary exercising in growing rats." *Med Sci Sports Exerc* **32**(9): 1562-9.
- Hou, C. H., J. Lin, et al. (2009). "Ultrasound stimulates NF-kappaB activation and iNOS expression via the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway in cultured preosteoblasts." *J Cell Physiol* **220**(1): 196-203.
- Hsieh, Y. F. and C. H. Turner (2001). "Effects of loading frequency on mechanically induced bone formation." *J Bone Miner Res* **16**(5): 918-24.
- Hulbert, S. F., F. A. Young, et al. (1970). "Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses." *J Biomed Mater Res* **4**(3): 433-56.
- Hung, C. T., S. R. Pollack, et al. (1995). "Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow." *Clin Orthop Relat Res*(313): 256-69.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-87.
- Ignatius, A., H. Blessing, et al. (2004). "[Effects of mechanical strain on human osteoblastic precursor cells in type I collagen matrices]." *Orthopade* **33**(12): 1386-93.
- Ignatius, A., H. Blessing, et al. (2005). "Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices." *Biomaterials* **26**(3): 311-8.

- Ingber, D. E. (2003). "Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology." *J Cell Sci* **116**(Pt 7): 1157-73.
- Ingber, D. E. (2003). "Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks." *J Cell Sci* **116**(Pt 8): 1397-408.
- Ingber, D. E. (2008). "Tensegrity and mechanotransduction." *J Bodyw Mov Ther* **12**(3): 198-200.
- Ingber, D. E., L. Dike, et al. (1994). "Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis." *Int Rev Cytol* **150**: 173-224.
- Ishaug, S. L., G. M. Crane, et al. (1997). "Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds." *J Biomed Mater Res* **36**(1): 17-28.
- Ishijima, M., S. R. Rittling, et al. (2001). "Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin." *J Exp Med* **193**(3): 399-404.
- Ishijima, M., K. Tsuji, et al. (2002). "Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice." *J Bone Miner Res* **17**(4): 661-7.
- Itoh, S., S. Nakamura, et al. (2006). "Enhanced bone ingrowth into hydroxyapatite with interconnected pores by Electrical Polarization." *Biomaterials* **27**(32): 5572-9.
- Jaffe, L. F. and R. Nuccitelli (1977). "Electrical controls of development." *Annu Rev Biophys Bioeng* **6**: 445-76.
- Jagodzinski, M., A. Breitbart, et al. (2008). "Influence of perfusion and cyclic compression on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells in 3-dimensional culture." *J Biomech* **41**(9): 1885-91.
- Johnson, M. W., W. S. Williams, et al. (1980). "Ceramic models for piezoelectricity in dry bone." *J Biomech* **13**(7): 565-73.
- Judex, S., S. Boyd, et al. (2003). "Adaptations of trabecular bone to low magnitude vibrations result in more uniform stress and strain under load." *Ann Biomed Eng* **31**(1): 12-20.
- Judex, S., S. Gupta, et al. (2009). "Regulation of mechanical signals in bone." *Orthod Craniofac Res* **12**(2): 94-104.
- Kaigler, D., Z. Wang, et al. (2006). "VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects." *J Bone Miner Res* **21**(5): 735-44.
- Kannus, P., H. Haapasalo, et al. (1995). "Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players." *Ann Intern Med* **123**(1): 27-31.
- Karadag, A. and L. W. Fisher (2006). "Bone sialoprotein enhances migration of bone marrow stromal cells through matrices by bridging MMP-2 to $\alpha(v)\beta3$ -integrin." *J Bone Miner Res* **21**(10): 1627-36.
- Karageorgiou, V. and D. Kaplan (2005). "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis." *Biomaterials* **26**(27): 5474-91.
- Kaspar, D., W. Seidl, et al. (2002). "Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain." *J Biomech* **35**(7): 873-80.
- Kaspar, D., W. Seidl, et al. (2000). "In vitro effects of dynamic strain on the proliferative and metabolic activity of human osteoblasts." *J Musculoskelet Neuronal Interact* **1**(2): 161-4.
- Kaspar, D., W. Seidl, et al. (2000). "Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity." *J Biomech* **33**(1): 45-51.

- Khatib, L., D. E. Golan, et al. (2004). "Physiologic electrical stimulation provokes intracellular calcium increase mediated by phospholipase C activation in human osteoblasts." *Faseb J* **18**(15): 1903-5.
- Kim, C. H., S. L. Cheng, et al. (1999). "Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss." *J Endocrinol* **162**(3): 371-9.
- Kim, I. S., J. K. Song, et al. (2009). "Novel Effect of Biphasic Electric Current on In Vitro Osteogenesis and Cytokine Production in Human Mesenchymal Stromal Cells." *Tissue Eng Part A*.
- Kim, I. S., J. K. Song, et al. (2006). "Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts." *Biochim Biophys Acta* **1763**(9): 907-16.
- Kim, T., M. T. Kao, et al. (2007). "Active alignment of microtubules with electric fields." *Nano Lett* **7**(1): 211-7.
- Kim, T. J., J. Seong, et al. (2009). "Substrate rigidity regulates Ca²⁺ oscillation via RhoA pathway in stem cells." *J Cell Physiol* **218**(2): 285-93.
- Kimoto, S., S. L. Cheng, et al. (1994). "The effect of glucocorticoid on the synthesis of biglycan and decorin in human osteoblasts and bone marrow stromal cells." *Endocrinology* **135**(6): 2423-31.
- Klees, R. F., R. M. Salaszyk, et al. (2005). "Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway." *Mol Biol Cell* **16**(2): 881-90.
- Klein-Nulend, J., M. H. Helfrich, et al. (1998). "Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent." *Biochem Biophys Res Commun* **250**(1): 108-14.
- Klein-Nulend, J., C. M. Semeins, et al. (1995). "Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts--correlation with prostaglandin upregulation." *Biochem Biophys Res Commun* **217**(2): 640-8.
- Kolodziejska, K. E., A. R. Burns, et al. (2005). "Regulation of inducible nitric oxide synthase by aggresome formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(13): 4854-9.
- Komori, T., H. Yagi, et al. (1997). "Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts." *Cell* **89**(5): 755-64.
- Korostoff, E. (1979). "A linear piezoelectric model for characterizing stress generated potentials in bone." *J Biomech* **12**(5): 335-47.
- Kuno, M., S. Takai, et al. (2009). "Rho-kinase inhibitors decrease TGF-beta-stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts." *Biochem Pharmacol* **77**(2): 196-203.
- Lanyon, L. E. and C. T. Rubin (1984). "Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling." *J Biomech* **17**(12): 897-905.
- Laroche, G., Y. Marois, et al. (1995). "Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: from polymeric raw material to monofilament vascular suture." *J Biomed Mater Res* **29**(12): 1525-36.
- Le Huec, J. C., T. Schaefferbeke, et al. (1995). "Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress." *Biomaterials* **16**(2): 113-8.
- Leboy, P. S., J. N. Beresford, et al. (1991). "Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures." *J Cell Physiol* **146**(3): 370-8.
- Lee, J. H. and K. J. McLeod (2000). "Morphologic responses of osteoblast-like cells in monolayer culture to ELF electromagnetic fields." *Bioelectromagnetics* **21**(2): 129-36.
- Levin, M. (2007). "Large-scale biophysics: ion flows and regeneration." *Trends Cell Biol* **17**(6): 261-70.

- Li, X. and J. Kolega (2002). "Effects of direct current electric fields on cell migration and actin filament distribution in bovine vascular endothelial cells." *J Vasc Res* **39**(5): 391-404.
- Liedert, A., D. Kaspar, et al. (2006). "Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells." *Biochem Biophys Res Commun* **349**(1): 1-5.
- Lirani-Galvao, A. P., P. Chavassieux, et al. (2009). "Low-intensity electrical stimulation counteracts the effects of ovariectomy on bone tissue of rats: effects on bone microarchitecture, viability of osteocytes, and nitric oxide expression." *Calcif Tissue Int* **84**(6): 502-9.
- Liu, S., J. Zhou, et al. (2008). "Pathogenic role of Fgf23 in Dmpl-null mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(2): E254-61.
- Lund, A. W., B. Yener, et al. (2009). "The natural and engineered 3D microenvironment as a regulatory cue during stem cell fate determination." *Tissue Eng Part B Rev* **15**(3): 371-80.
- Maimoun, L., D. Mariano-Goulart, et al. (2004). "Effects of physical activities that induce moderate external loading on bone metabolism in male athletes." *J Sports Sci* **22**(9): 875-83.
- Malaval, L. (2008). "Matrice Osseuse." *Dans: MC. de Vernejoul et P. Marie Editeurs. Traité des maladies métaboliques osseuses de l'adulte. Flammarion p 30-43.*
- Malaval, L., N. M. Wade-Gueye, et al. (2008). "Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis." *J Exp Med* **205**(5): 1145-53.
- Maniotis, A. J., C. S. Chen, et al. (1997). "Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(3): 849-54.
- Manolagas, S. C. (2000). "Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis." *Endocr Rev* **21**(2): 115-37.
- Mao, Y. and J. E. Schwarzbauer (2005). "Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process." *Matrix Biol* **24**(6): 389-99.
- Marie, P. (1994). "[Growth factors and bone tissue. Implications in the formation of bone matrix]." *Ann Endocrinol (Paris)* **55**(2): 85-9.
- Marie, P. J. (2003). "Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation." *Gene* **316**: 23-32.
- Marie, P. J. (2008). "Transcription factors controlling osteoblastogenesis." *Arch Biochem Biophys* **473**(2): 98-105.
- Marie, P. J., F. Debais, et al. (2002). "Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling." *Histol Histopathol* **17**(3): 877-85.
- Marie, P. J., M. Hott, et al. (1990). "Effects of epidermal growth factor on bone formation and resorption in vivo." *Am J Physiol* **258**(2 Pt 1): E275-81.
- Martin, I., D. Wendt, et al. (2004). "The role of bioreactors in tissue engineering." *Trends Biotechnol* **22**(2): 80-6.
- Martino, C. F., D. Belchenko, et al. (2008). "The effects of pulsed electromagnetic fields on the cellular activity of SaOS-2 cells." *Bioelectromagnetics* **29**(2): 125-32.
- Mayer, H., H. Bertram, et al. (2005). "Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation." *J Cell Biochem* **95**(4): 827-39.
- McBeath, R., D. M. Pirone, et al. (2004). "Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment." *Dev Cell* **6**(4): 483-95.
- McCaig, C. D., A. M. Rajnicek, et al. (2005). "Controlling cell behavior electrically: current views and future potential." *Physiol Rev* **85**(3): 943-78.

- McDonald (1993). "**Electrical effects at the bone surface.**" *Eur J Orthod* **15**(3):175-83.
- McGarry, J. G., J. Klein-Nulend, et al. (2005). "A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses--a computational and experimental study." *Faseb J* **19**(3): 482-4.
- Mendoza, M. M.** (2003). Influence and effects of DC electric fields on bone cells.
- Meyer, U., M. Terodde, et al. (2001). "[Mechanical stimulation of osteoblasts in cell culture]." *Mund Kiefer Gesichtschir* **5**(3): 166-72.
- Midura, R. J., C. J. Dillman, et al. (2005). "Low amplitude, high frequency strains imposed by electrically stimulated skeletal muscle retards the development of osteopenia in the tibiae of hindlimb suspended rats." *Med Eng Phys* **27**(4): 285-93.
- Minary-Jolandan, M. and M. F. Yu (2009). "Nanoscale characterization of isolated individual type I collagen fibrils: polarization and piezoelectricity." *Nanotechnology* **20**(8): 85706.
- Minary-Jolandan, M. and M. F. Yu (2009). "Uncovering Nanoscale Electromechanical Heterogeneity in the Subfibrillar Structure of Collagen Fibrils Responsible for the Piezoelectricity of Bone." *ACS Nano*.
- Mirams, M., B. G. Robinson, et al. (2004). "Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate?" *Bone* **35**(5): 1192-9.
- Mitra, S. K., D. A. Hanson, et al. (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1): 56-68.
- Mitsui, N., N. Suzuki, et al. (2005). "Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone sialoprotein and prostaglandin E(2) production appropriately." *Life Sci* **77**(25): 3168-82.
- Morinobu, M., M. Ishijima, et al. (2003). "Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo." *J Bone Miner Res* **18**(9): 1706-15.
- Moursi, A. M., C. H. Damsky, et al. (1996). "Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation." *J Cell Sci* **109** (Pt 6): 1369-80.
- Moursi, A. M., R. K. Globus, et al. (1997). "Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro." *J Cell Sci* **110** (Pt 18): 2187-96.
- Murphy-Ullrich, J. E. (2001). "The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?" *J Clin Invest* **107**(7): 785-90.
- Naegele, R. J., J. Lipari, et al. (1991). "Electric field stimulation of human osteosarcoma-derived cells: a dose-response study." *Cancer Biochem Biophys* **12**(2): 95-101.
- Neidlinger-Wilke, C., I. Stalla, et al. (1995). "Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGF beta-release in response to cyclic strain." *J Biomech* **28**(12): 1411-8.
- Neidlinger-Wilke, C., H. J. Wilke, et al. (1994). "Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application." *J Orthop Res* **12**(1): 70-8.
- Noris-Suarez, K., J. Lira-Olivares, et al. (2007). "In vitro deposition of hydroxyapatite on cortical bone collagen stimulated by deformation-induced piezoelectricity." *Biomacromolecules* **8**(3): 941-8.
- Norton, L. A., K. L. Andersen, et al. (1995). "A methodical study of shape changes in human oral cells perturbed by a simulated orthodontic strain in vitro." *Arch Oral Biol* **40**(9): 863-72.
- Nowick, A. S. (1975). "Piezoelectric properties of bone as functions of moisture content." *Nature* **253**(5493): 626-7.

- Nuccitelli, R. (2003). "A role for endogenous electric fields in wound healing." *Curr Top Dev Biol* **58**: 1-26.
- Oberhauser, A. F., C. Badilla-Fernandez, et al. (2002). "The mechanical hierarchies of fibronectin observed with single-molecule AFM." *J Mol Biol* **319**(2): 433-47.
- Okamoto, M., Y. Dohi, et al. (2006). "Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells." *J Mater Sci Mater Med* **17**(4): 327-36.
- Olivotto, M., A. Arcangeli, et al. (1996). "Electric fields at the plasma membrane level: a neglected element in the mechanisms of cell signalling." *Bioessays* **18**(6): 495-504.
- Orlandini, M., A. Spreafico, et al. (2006). "Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation." *J Biol Chem* **281**(26): 17961-7.
- Otter, M., S. Goheen, et al. (1988). "Streaming potentials in chemically modified bone." *J Orthop Res* **6**(3): 346-59.
- Otter, M. W., K. J. McLeod, et al. (1998). "Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair." *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl): S90-104.
- Otto, F., H. Kanegane, et al. (2002). "Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia." *Hum Mutat* **19**(3): 209-16.
- Oxlund, B. S., G. Ortoft, et al. (2003). "Low-intensity, high-frequency vibration appears to prevent the decrease in strength of the femur and tibia associated with ovariectomy of adult rats." *Bone* **32**(1): 69-77.
- Panagopoulos, D. J., N. Messini, et al. (2000). "A mechanism for action of oscillating electric fields on cells." *Biochem Biophys Res Commun* **272**(3): 634-40.
- Pankov, R., E. Cukierman, et al. (2000). "Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis." *J Cell Biol* **148**(5): 1075-90.
- Park, J. E., G. A. Keller, et al. (1993). "The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF." *Mol Biol Cell* **4**(12): 1317-26.
- Pitsillides, A. A., S. C. Rawlinson, et al. (1995). "Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling?" *Faseb J* **9**(15): 1614-22.
- Prisby, R. D., M. H. Lafage-Proust, et al. (2008). "Effects of whole body vibration on the skeleton and other organ systems in man and animal models: what we know and what we need to know." *Ageing Res Rev* **7**(4): 319-29.
- Pu, J. and M. Zhao (2005). "Golgi polarization in a strong electric field." *J Cell Sci* **118**(Pt 6): 1117-28.
- Qi, M. C., J. Hu, et al. (2008). "Mechanical strain induces osteogenic differentiation: Cbfa1 and Ets-1 expression in stretched rat mesenchymal stem cells." *Int J Oral Maxillofac Surg* **37**(5): 453-8.
- Qin, Y. X., C. T. Rubin, et al. (1998). "Nonlinear dependence of loading intensity and cycle number in the maintenance of bone mass and morphology." *J Orthop Res* **16**(4): 482-9.
- Quarles, L. D. (2008). "Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation." *J Clin Invest* **118**(12): 3820-8.
- Quarles, L. D., D. A. Yohay, et al. (1992). "Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development." *J Bone Miner Res* **7**(6): 683-92.
- Raisz, L. G. (1999). "Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology." *Osteoarthritis Cartilage* **7**(4): 419-21.

- Raizman, I., J. N. De Croos, et al. (2009). "Articular Cartilage Subpopulations Respond Differently to Cyclic Compression in vitro." *Tissue Eng Part A*.
- Rath, B., J. Nam, et al. (2008). "Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts." *J Biomech* **41**(5): 1095-103.
- Rawlinson, S. C., J. R. Mosley, et al. (1995). "Calvarial and limb bone cells in organ and monolayer culture do not show the same early responses to dynamic mechanical strain." *J Bone Miner Res* **10**(8): 1225-32.
- Reher, P., N. Doan, et al. (1999). "Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF." *Cytokine* **11**(6): 416-23.
- Reznikoff, C. A., D. W. Brankow, et al. (1973). "Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division." *Cancer Res* **33**(12): 3231-8.
- Ricard-Blum, S. and F. Ruggiero (2005). "The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane." *Pathol Biol (Paris)* **53**(7): 430-42.
- Robling, A. G., D. B. Burr, et al. (2000). "Partitioning a daily mechanical stimulus into discrete loading bouts improves the osteogenic response to loading." *J Bone Miner Res* **15**(8): 1596-602.
- Rodriguez-Ruiz, R. and E. Suaste-Gomez (2007). "Development of lead-free (Bi 1/2 Na 1/2)BaTiO₃ piezoelectric ceramics for clinical applications." *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2007**: 2223-6.
- Rosen, C. J. (2004). "What's new with PTH in osteoporosis: where are we and where are we headed?" *Trends Endocrinol Metab* **15**(5): 229-33.
- Rosenberg, N., M. Levy, et al. (2002). "Experimental model for stimulation of cultured human osteoblast-like cells by high frequency vibration." *Cytotechnology* **39**(3): 125-30.
- Rossi, M. I., A. P. Barros, et al. (2005). "Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional in vitro culture system for the study of hematopoietic cell migration." *Braz J Med Biol Res* **38**(10): 1455-62.
- Roy, T. D., J. L. Simon, et al. (2003). "Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques." *J Biomed Mater Res A* **66**(2): 283-91.
- Rubin, C., R. Recker, et al. (2004). "Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety." *J Bone Miner Res* **19**(3): 343-51.
- Rubin, C., A. S. Turner, et al. (2001). "Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones." *Nature* **412**(6847): 603-4.
- Rubin, C., G. Xu, et al. (2001). "The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli." *Faseb J* **15**(12): 2225-9.
- Rubin, C. T. and K. J. McLeod (1994). "Promotion of bony ingrowth by frequency-specific, low-amplitude mechanical strain." *Clin Orthop Relat Res*(298): 165-74.
- Rubin, J., C. Rubin, et al. (2006). "Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone." *Gene* **367**: 1-16.
- Saito, M., S. Soshi, et al. (2004). "Intensity-related differences in collagen post-translational modification in MC3T3-E1 osteoblasts after exposure to low- and high-intensity pulsed ultrasound." *Bone* **35**(3): 644-55.
- Salasznyk, R. M., W. A. Williams, et al. (2004). "Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells." *J Biomed Biotechnol* **2004**(1): 24-34.

- Schaffer, J. L., M. Rizen, et al. (1994). "Device for the application of a dynamic biaxially uniform and isotropic strain to a flexible cell culture membrane." *J Orthop Res* **12**(5): 709-19.
- Schmid, C., I. Schlapfer, et al. (1992). "Differential regulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 mRNA in liver and bone cells by insulin and retinoic acid in vitro." *FEBS Lett* **303**(2-3): 205-9.
- Schwarzbauer, J. E. and J. L. Sechler (1999). "Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly." *Curr Opin Cell Biol* **11**(5): 622-7.
- Scutt, A. and P. Bertram (1995). "Bone marrow cells are targets for the anabolic actions of prostaglandin E2 on bone: induction of a transition from nonadherent to adherent osteoblast precursors." *J Bone Miner Res* **10**(3): 474-87.
- Shen, Y. H., M. S. Shoichet, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells." *Acta Biomater* **4**(3): 477-89.
- Sittichockechaiwut, A., A. M. Scutt, et al. (2009). "Use of rapidly mineralising osteoblasts and short periods of mechanical loading to accelerate matrix maturation in 3D scaffolds." *Bone* **44**(5): 822-9.
- Smalt, R., F. T. Mitchell, et al. (1997). "Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain." *Am J Physiol* **273**(4 Pt 1): E751-8.
- Sommerfeldt, D. W. and C. T. Rubin (2001). "Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton." *Eur Spine J* **10 Suppl 2**: S86-95.
- Song, B., Y. Gu, et al. (2007). "Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo." *Nat Protoc* **2**(6): 1479-89.
- Soong, H. K., W. C. Parkinson, et al. (1990). "Movements of cultured corneal epithelial cells and stromal fibroblasts in electric fields." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**(11): 2278-82.
- Sottile, J. and D. C. Hocking (2002). "Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions." *Mol Biol Cell* **13**(10): 3546-59.
- Spadaro, J. A. (1997). "Mechanical and electrical interactions in bone remodeling." *Bioelectromagnetics* **18**(3): 193-202.
- Stein, G. S., J. B. Lian, et al. (2004). "Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression." *Oncogene* **23**(24): 4315-29.
- Sun, S., I. Titushkin, et al. (2006). "Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus." *Bioelectrochemistry* **69**(2): 133-41.
- Sundelacruz, S., M. Levin, et al. (2008). "Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells." *PLoS One* **3**(11): e3737.
- Tanaka, S. M., I. M. Alam, et al. (2003). "Stochastic resonance in osteogenic response to mechanical loading." *Faseb J* **17**(2): 313-4.
- Tanaka, S. M., J. Li, et al. (2003). "Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts." *J Biomech* **36**(1): 73-80.
- Tang, C. H., D. Y. Lu, et al. (2007). "Ultrasound induces hypoxia-inducible factor-1 activation and inducible nitric-oxide synthase expression through the integrin/integrin-linked kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway in osteoblasts." *J Biol Chem* **282**(35): 25406-15.
- Torcasio, A., G. H. van Lenthe, et al. (2008). "The importance of loading frequency, rate and vibration for enhancing bone adaptation and implant osseointegration." *Eur Cell Mater* **16**: 56-68.

- Toyosawa, S., S. Shintani, et al. (2001). "Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts." *J Bone Miner Res* **16**(11): 2017-26.
- Tsai, M. T., W. H. Chang, et al. (2007). "Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering." *Bioelectromagnetics* **28**(7): 519-28.
- Tsuruga, E., H. Takita, et al. (1997). "Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis." *J Biochem* **121**(2): 317-24.
- Turner, C. H. and F. M. Pavalko (1998). "Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation." *J Orthop Sci* **3**(6): 346-55.
- Turner, C. H., Y. Takano, et al. (1996). "Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats." *Am J Physiol* **270**(4 Pt 1): E634-9.
- Turner, C. H., T. Yoshikawa, et al. (1995). "High frequency components of bone strain in dogs measured during various activities." *J Biomech* **28**(1): 39-44.
- Tye, C. E., G. K. Hunter, et al. (2005). "Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction." *J Biol Chem* **280**(14): 13487-92.
- van Bezooijen, R. L., B. A. Roelen, et al. (2004). "Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist." *J Exp Med* **199**(6): 805-14.
- Vander Molen, M. A., H. J. Donahue, et al. (2000). "Osteoblastic networks with deficient coupling: differential effects of magnetic and electric field exposure." *Bone* **27**(2): 227-31.
- Velling, T., J. Risteli, et al. (2002). "Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins $\alpha 11\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$." *J Biol Chem* **277**(40): 37377-81.
- Verschuere, S. M., M. Roelants, et al. (2004). "Effect of 6-month whole body vibration training on hip density, muscle strength, and postural control in postmenopausal women: a randomized controlled pilot study." *J Bone Miner Res* **19**(3): 352-9.
- Vico, L., P. Collet, et al. (2000). "Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts." *Lancet* **355**(9215): 1607-11.
- Walsh, S., C. Jefferiss, et al. (2000). "Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4." *Bone* **27**(2): 185-95.
- Wan, C., S. R. Gilbert, et al. (2008). "Activation of the hypoxia-inducible factor-1 α pathway accelerates bone regeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(2): 686-91.
- Wang, N., J. P. Butler, et al. (1993). "Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton." *Science* **260**(5111): 1124-7.
- Wang, W., S. Itoh, et al. (2009). "Comparison of enhancement of bone ingrowth into hydroxyapatite ceramics with highly and poorly interconnected pores by electrical polarization." *Acta Biomater* **5**(8): 3132-40.
- Wang, Y., C. Wan, et al. (2007). "The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development." *J Clin Invest* **117**(6): 1616-26.
- Weyts, F. A., B. Bosmans, et al. (2003). "Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation." *Calcif Tissue Int* **72**(4): 505-12.
- Wiesmann, H., M. Hartig, et al. (2001). "Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro." *Biochim Biophys Acta* **1538**(1): 28-37.

- Wijelath, E. S., J. Murray, et al. (2002). "Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity." *Circ Res* **91**(1): 25-31.
- Williams, W. S. and L. Breger (1974). "Analysis of stress distribution and piezoelectric response in cantilever bending of bone and tendon." *Ann N Y Acad Sci* **238**: 121-30.
- Wolchok, J. C., C. Brokopp, et al. (2009). "The effect of bioreactor induced vibrational stimulation on extracellular matrix production from human derived fibroblasts." *Biomaterials* **30**(3): 327-35.
- Xiao, G., D. Jiang, et al. (2002). "Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2." *J Biol Chem* **277**(39): 36181-7.
- Xiao, L., T. Naganawa, et al. (2004). "Stat1 controls postnatal bone formation by regulating fibroblast growth factor signaling in osteoblasts." *J Biol Chem* **279**(26): 27743-52.
- Xu, J., M. Liu, et al. (1996). "Mechanical strain induces constitutive and regulated secretion of glycosaminoglycans and proteoglycans in fetal lung cells." *J Cell Sci* **109** (Pt 6): 1605-13.
- Yao, Z., M. H. Lafage-Proust, et al. (2004). "Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF." *J Bone Miner Res* **19**(9): 1471-80.
- Yasuda, I., K. Noguchi and T. Sata (1955). "Dynamic callus and electric callus." *J. Bone and Joint Surg* **37A**:1292.
- Yonemori, K., S. Matsunaga, et al. (1996). "Early effects of electrical stimulation on osteogenesis." *Bone* **19**(2): 173-80.
- Yoshitake, H., S. R. Rittling, et al. (1999). "Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8156-60.
- You, J., G. C. Reilly, et al. (2001). "Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts." *J Biol Chem* **276**(16): 13365-71.
- You, J., C. E. Yellowley, et al. (2000). "Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow." *J Biomech Eng* **122**(4): 387-93.
- Zaman, G., A. A. Pitsillides, et al. (1999). "Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes." *J Bone Miner Res* **14**(7): 1123-31.
- Zaman, G., R. F. Suswillo, et al. (1997). "Early responses to dynamic strain change and prostaglandins in bone-derived cells in culture." *J Bone Miner Res* **12**(5): 769-77.
- Zelzer, E., W. McLean, et al. (2002). "Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis." *Development* **129**(8): 1893-904.
- Zhang, J., Q. Tu, et al. (2009). "Applications of transgenics in studies of bone sialoprotein." *J Cell Physiol* **220**(1): 30-4.
- Zhang, Y., Y. He, et al. (2009). "Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype." *Biomaterials* **30**(23-24): 4021-8.
- Zhao, L., G. Li, et al. (2009). "Comparison of multipotent differentiation potentials of murine primary bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cell line C3H10T1/2." *Calcif Tissue Int* **84**(1): 56-64.
- Zhao, M. (2009). "Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration." *Semin Cell Dev Biol* **20**(6): 674-82.
- Zhao, M., H. Bai, et al. (2004). "Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors." *J Cell Sci* **117**(Pt 3): 397-405.

- Zhao, M., J. V. Forrester, et al. (1999). "A small, physiological electric field orients cell division." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 4942-6.
- Zhao, M., T. Jin, et al. (2002). "Genetic analysis of the role of G protein-coupled receptor signaling in electrotaxis." *J Cell Biol* **157**(6): 921-7.
- Zhong, C., M. Chrzanowska-Wodnicka, et al. (1998). "Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly." *J Cell Biol* **141**(2): 539-51.
- Zhu, J., X. Zhang, et al. (2008). "Different Magnitudes of Tensile Strain Induce Human Osteoblasts Differentiation Associated with the Activation of ERK1/2 Phosphorylation." *Int J Mol Sci* **9**(12): 2322-32.
- Zhu, J., X. Zhang, et al. (2009). "Periprosthetic strain magnitude-dependent upregulation of type I collagen synthesis in human osteoblasts through an ERK1/2 pathway." *Int Orthop*.
- Zhu, J. F., X. L. Zhang, et al. (2009). "[Human osteoblasts response to different magnitudes of mechanical stimulation in vitro]." *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* **47**(5): 381-4.
- Zhuang, H., W. Wang, et al. (1997). "Electrical stimulation induces the level of TGF-beta1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **237**(2): 225-9.
- Zhuang, H., W. Wang, et al. (1996). "Mechanical strain-induced proliferation of osteoblastic cells parallels increased TGF-beta 1 mRNA." *Biochem Biophys Res Commun* **229**(2): 449-53.

PRODUCTIONS PERSONNELLES

Articles

2009

The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression. **Dumas V**, Perrier A, Malaval L, Laroche N, Guignandon A, Vico L, Rattner A. *Biomaterials* 30 (2009) 3279–3288 (impact factor 6,6)

2010

Apatite content of collagen materials dose-dependently increases pre-osteoblastic cell deposition of a cement line-like matrix. A. Perrier A., **Dumas V.**, Linossier M.T., Fournier C., Jurdic P., Rattner A., Vico L., Guignando A. *Bone* (2010), doi:10.1016/j.bone.2010.03.010 (impact factor 4,1).

2010

Extracellular matrix produced by osteoblasts cultured under microdeformations is favourable to osteogenic differentiation of MSCs. **Dumas V.**, Ducharne B., Guyomar D., Perrier A., Fournier C., Thomas M., Guignandon A., Peyroche S., Vico L., Rattner A. *soumis à Calcified Tissue International (impact factor 2,7)*

Communications orales

2007

Fonctionnalisation de céramiques macroporeuses cellularisées par des contraintes mécaniques de faibles amplitudes **Dumas V.**, Laroche N., Vico L, Rattner A. *Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (nationale avec comité scientifique)*

2008

Effets des stimulations mécaniques et/ou électriques sur le comportement ostéoblastique : implication en ingénierie tissulaire **Dumas V**, Guyomar D, Ducharne B, Perrier A., Guignandon A, Vico L, Rattner A. *Conférence MACODEV.*

2009

Etude des effets des microdéformations induites par piézoélectricité sur l'activité ostéoblastique. **Dumas V**, Guyomar D, Ducharne B, Guignandon A, Vico L, Rattner A. *Conférence MACODEV.*

Communications affichées

2008

Culture ostéoblastique dans des matériaux poreux. Effets des contraintes mécaniques. **Dumas V**, Laroche N., Palle S., Vico L, Rattner A. *Colloque "Innovez dans les implants orthopédiques - Pérennité des prothèses : matériaux, tribocorrosion, simulation numérique.*

2009

Stimulations mécaniques et/ou électriques sur l'activité de cellules ostéoformatrices. Des substituts osseux piézoélectriques ? **Dumas V**, Guyomar D, Ducharne B, perrier A., Guignandon A, Vico L, Rattner A. *Journée de l'école doctorale de Saint Etienne.*

2009

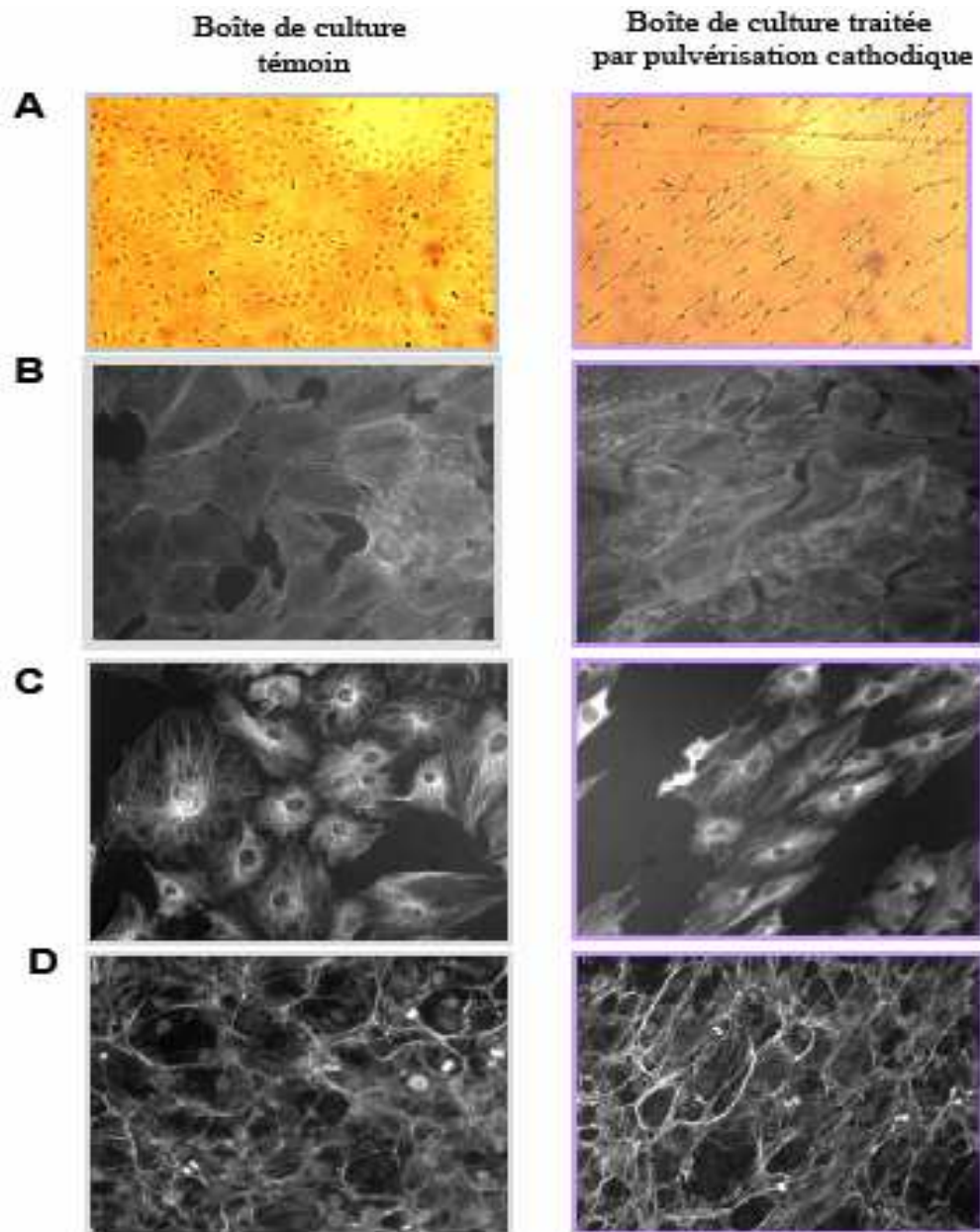
Un remodelage osseux en boîte de Petri ? Perrier A., Fournier C., **Dumas V.**, Linossier M.T., Jurdic P. Vico L., Guignandon A. *Journée de l'école doctorale de Saint Etienne.*

2010

Effect of Extracellular Matrix Laid Down by Micromechanical-Stimulated Osteoblasts on Mesenchymal Stem Cells Behaviour. **V. Dumas**, D. Guyomar, B. Ducharne, A. Perrier, A. Guignandon, L. Vico, A. Rattner. *31st Annual Meeting, American Society for Bone and Mineral Research. DENVER. (avec comité scientifique et acte)*

ANNEXES

Cultures d'ostéoblastes dans les boîtes comportant des électrodes déposées par pulvérisation cathodique



Morphologie des pré-ostéoblastes MC3T3-E1 X50 (A), marquages fluorescents du cytosquelette d'actine X200 (B), de la tubuline X200 (C) et de la fibronectine X200 (D)

Liste des amorces utilisées dans le microarray (angiogénèse) :

PCR Array Catalog #:		PAHS-024			
Position	UniGene	RefSeq	Symbol	Description	Gene Name
A01	Hs.525622	NM_005163	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT/PKB
A02	Hs.369675	NM_001146	ANGPT1	Angiopoietin 1	AGP1/AGPT
A03	Hs.583870	NM_001147	ANGPT2	Angiopoietin 2	AGPT2/ANG2
A04	Hs.209153	NM_014495	ANGPTL3	Angiopoietin-like 3	ANGPT5
A05	Hs.9613	NM_001039667	ANGPTL4	Angiopoietin-like 4	ANGPTL2/ARP4
A06	Hs.1239	NM_001150	ANPEP	Alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)	APN/CD13
A07	Hs.194654	NM_001702	BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	FLJ41988
A08	Hs.54460	NM_002986	CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	SCYA11
A09	Hs.303649	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCF-2/GDCF-2 HC11
A10	Hs.76206	NM_001795	CDH5	Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)	7B4/CD144
A11	Hs.517356	NM_030582	COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1	KNO
A12	Hs.570065	NM_000091	COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	TUMSTATIN
B01	Hs.789	NM_001511	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	FSP/GRO1
B02	Hs.632586	NM_001565	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7/IFI10
B03	Hs.89690	NM_002090	CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CINC-2b/GRO3
B04	Hs.89714	NM_002994	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	ENA-78/SCYB5
B05	Hs.164021	NM_002993	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CKA-3/GCP-2
B06	Hs.77367	NM_002416	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CMK/Humig
B07	Hs.592212	NM_001953	TYMP	Thymidine phosphorylase	ECGF1/MNGIE
B08	Hs.154210	NM_001400	EDG1	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	CHEDG1/D1S3362
B09	Hs.516664	NM_182685	EFNA1	Ephrin-A1	B61/ECKLG
B10	Hs.516656	NM_004952	EFNA3	Ephrin-A3	EFL2/EPLG3
B11	Hs.149239	NM_004093	EFNB2	Ephrin-B2	EPLG5/HTKL
B12	Hs.419815	NM_001963	EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)	HOMG4/URG
C01	Hs.76753	NM_000118	ENG	Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	CD105/END
C02	Hs.437008	NM_004444	EPHB4	EPH receptor B4	HTK/MYK1
C03	Hs.115263	NM_001432	EREG	Epiregulin	ER
C04	Hs.483635	NM_000800	FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	AFGF/ECGF
C05	Hs.284244	NM_002006	FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	BFGF/FGFB
C06	Hs.1420	NM_000142	FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)	ACH/CD333
C07	Hs.11392	NM_004469	FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	VEGF-D/VEGFD
C08	Hs.654360	NM_002019	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	FLT/VEGFR1

C09	Hs.388245	NM_021973	HAND2	Heart and neural crest derivatives expressed 2	DHAND2/Hed
C10	Hs.396530	NM_000601	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	F-TCF/HGFB
C11	Hs.654600	NM_001530	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF-1alpha/HIF1
C12	Hs.44227	NM_006665	HPSE	Heparanase	HPA/HPR1
D01	Hs.504609	NM_002165	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID
D02	Hs.76884	NM_002167	ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	HEIR-1
D03	Hs.37026	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1	IFL/IFN
D04	Hs.93177	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFB/IFF
D05	Hs.856	NM_000619	IFNG	Interferon, gamma	IFG/IFI
D06	Hs.160562	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGFI
D07	Hs.126256	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta	IL-1/IL1-BETA
D08	Hs.654458	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	BSF2/HGF
D09	Hs.624	NM_000584	IL8	Interleukin 8	3-10C/AMCF-I
D10	Hs.436873	NM_002210	ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	CD51/DKFZp686A08142
D11	Hs.218040	NM_000212	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	CD61/GP3A
D12	Hs.224012	NM_000214	JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome)	AGS/AHD
E01	Hs.479756	NM_002253	KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	CD309/FLK1
E02	Hs.473256	NM_005560	LAMA5	Laminin, alpha 5	KIAA1907
E03	Hs.421391	NM_007015	LECT1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	BRICD3/CHM-I
E04	Hs.194236	NM_000230	LEP	Leptin	OB/OBS
E05	Hs.82045	NM_002391	MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)	MK/NEGF2
E06	Hs.513617	NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	CLG4/CLG4A
E07	Hs.297413	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	CLG4B/GELB
E08	Hs.436100	NM_004557	NOTCH4	Notch homolog 4 (Drosophila)	INT3/NOTCH3
E09	Hs.131704	NM_003873	NRP1	Neuropilin 1	CD304/DKFZp686A03134
E10	Hs.471200	NM_003872	NRP2	Neuropilin 2	NP2/NPN2
E11	Hs.707991	NM_002607	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGF-A/PDGF1
E12	Hs.514412	NM_000442	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	CD31/PECAM-1
F01	Hs.81564	NM_002619	PF4	Platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif ligand 4))	CXCL4/SCYB4
F02	Hs.252820	NM_002632	PGF	Placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein	D12S1900/PGFL
F03	Hs.77274	NM_002658	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	ATF/UPA
F04	Hs.143436	NM_000301	PLG	Plasminogen	DKFZp779M0222
F05	Hs.125036	NM_020405	PLXDC1	Plexin domain containing 1	DKFZp686F0937/TEM3
F06	Hs.528665	NM_021935	PROK2	Prokineticin 2	BV8/KAL4
F07	Hs.201978	NM_000962	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX1/COX3
F08	Hs.532768	NM_002615	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived	EPC-1/PEDF

				factor), member 1	
F09	Hs.68061	NM_021972	SPHK1	Sphingosine kinase 1	SPHK
F10	Hs.301989	NM_015136	STAB1	Stabilin 1	CLEVER-1/FEEL-1
F11	Hs.89640	NM_000459	TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)	CD202B/TIE-2
F12	Hs.170009	NM_003236	TGFA	Transforming growth factor, alpha	TGFA
G01	Hs.645227	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	CED/DPD1
G02	Hs.133379	NM_003238	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	TGF-beta2
G03	Hs.494622	NM_004612	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)	AAT5/ACVRLK4
G04	Hs.164226	NM_003246	THBS1	Thrombospondin 1	THBS/TSP
G05	Hs.371147	NM_003247	THBS2	Thrombospondin 2	TSP2
G06	Hs.522632	NM_003254	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	CLGI/EPA
G07	Hs.633514	NM_003255	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	CSC-21K
G08	Hs.701968	NM_000362	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	HSMRK222/K222
G09	Hs.241570	NM_000594	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF/TNF-alpha
G10	Hs.525607	NM_006291	TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	B94
G11	Hs.73793	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	VEGF/VEGF-A
G12	Hs.435215	NM_005429	VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	Flt4-L/VRP
H01	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	B2M
H02	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	HGPRT/HPRT
H03	Hs.523185	NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
H04	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD
H05	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HIGX1A
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC

Plaque 96 puits (microarray) :

Array Layout											
AKT1 A01	ANGPT1 A02	ANGPT2 A03	ANGPTL3 A04	ANGPTL4 A05	ANPEP A06	BAI1 A07	CCL11 A08	CCL2 A09	CDH5 A10	COL18A1 A11	COL4A3 A12
CXCL1 B01	CXCL10 B02	CXCL3 B03	CXCL5 B04	CXCL6 B05	CXCL9 B06	TYMP B07	S1PR1 B08	EFNA1 B09	EFNA3 B10	EFNB2 B11	EGF B12
ENG C01	EPHB4 C02	EREG C03	FGF1 C04	FGF2 C05	FGFR3 C06	FIGF C07	FLT1 C08	HAND2 C09	HGF C10	HIF1A C11	HPSE C12
ID1 D01	ID3 D02	IFNA1 D03	IFNB1 D04	IFNG D05	IGF1 D06	IL1B D07	IL6 D08	IL8 D09	ITGAV D10	ITGB3 D11	JAG1 D12
KDR E01	LAMA5 E02	LECT1 E03	LEP E04	MDK E05	MMP2 E06	MMP9 E07	NOTCH4 E08	NRP1 E09	NRP2 E10	PDGFA E11	PECAM1 E12
PF4 F01	PGF F02	PLAU F03	PLG F04	PLXDC1 F05	PROK2 F06	PTGS1 F07	SERPINF1 F08	SPHK1 F09	STAB1 F10	TEK F11	TGFA F12
TGFB1 G01	TGFB2 G02	TGFBR1 G03	THBS1 G04	THBS2 G05	TIMP1 G06	TIMP2 G07	TIMP3 G08	TNF G09	TNFAIP2 G10	VEGFA G11	VEGFC G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13A H03	GAPDH H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12